"Über die Konstanz der Schwefelwasserstoffbildung bei Enterobacteriaceenarten"

---

von

Gerhard Müller

aus Karlsbad

1965

1967 № 194

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem Hygienisch-Bakteriologischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. M. Knorr

"Über die Konstanz der Schwefelwasserstoffbildung bei Enterobacteriaceenarten"

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
zu Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Gerhard Müller
aus Karlsbad

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Professor Dr. Dr. G. Steinhardt

Referent: Professor Dr. M. Knorr

Tag der mündlichen Prüfung: 11. August 1965

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Geschichtliches	4
Ausgangspunkt eigener Untersuchungen	11
Allgemeine Methodik	12
Eigene Untersuchungen	
I. Bleiazetatagar	
1. Variation des Agar-Agar-Gehaltes	22
2. Variation des pH-Wertes	25
3. Variation des Peptongehaltes	27
4. Variation der Peptonart	30
5. Dextrosezusatz	32
6. Brenztraubensäureesterzusatz	35
7. Variation der Fleischwasserkonzentration	36
8. Einfluß des Bodensatzes	39
9. Zusatz von 1-2 Tropfen $CaCl_2$-Lösung . .	47
10. Alter der Keime	49
11. Einfluß der Beimpfungsdichte	49
12. Einfluß der Luft	50
II. Eisengelatine nach KAUFFMANN	
1. Variation des Gelatinegehaltes	52
2. Variation des pH-Wertes	53
3. Variation des Peptongehaltes	55
4. Variation der Peptonart	57
5. Dextrosezusatz	59
6. Weitere Zusätze	60
7. Einfluß der Luft	60
Diskussion	64
Zusammenfassung	71
Schrifttum	74

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548828_0043

Einleitung

Seit 1877 (GAYON) wird die Bedeutung der Schwefelwasserstoffbildung durch Bakterien erörtert. Übersieht man die gesamte Literatur bis 1963, so läßt sich erkennen, daß immer wieder abweichende Ergebnisse zustandegekommen sind, ohne daß die Ursachen nachgewiesen werden konnten. Die H_2S-Bildung hat in der neuesten Zeit durch die Salmonellen-Bakteriologie an besonderer Bedeutung gewonnen, da - mit wenigen Ausnahmen - fast alle Arten Schwefelwasserstoff bilden. Weit schwieriger wird es, wenn die fehlende H_2S-Reaktion zur Erkennung von Bakterien benützt wird. So werden z.B. in der Literatur (VAUGHN u. LEVINE, BADER u. HOTZ) beim echten Escherichia coli - obwohl als H_2S-negativ bezeichnet - vereinzelt positive Raaktionen angegeben. Auch im Routinebetrieb unseres Institutes wurden in der letzten Zeit positive H_2S-Reaktionen von E. coli bei Verwendung des üblichen Bleiazetatagars gesehen, ohne daß den Ursachen nachgegangen worden wäre.

An der Zersetzung der Eiweiße sind nach RIPPEL-BALDES aerobe und anaerobe Mikroorganismen beteiligt, in erster Linie Proteusarten, aber auch Escherichia coli. Befindet sich

unter den Stoffen, die beim Abbau der Aminosäuren entstehen, auch H_2S, so bleibt zu fragen, welche Aminosäuren den Schwefel liefern. Im tierischen Eiweiß kommen hierbei nur Cystein, Cystin und Methionin in Frage.

LAMPEN und Mitarbeiter haben 1949 festgestellt, daß Escherichia coli, ausgehend vom Sulfatschwefel, Methionin synthetisieren kann. Folgende Syntheseschritte wurden belegt:

Sulfat- Sulfit - Sulfid - Kondensation mit Pyruvat (Brenztraubensäureester) - Cystein - Cystin - Methionin

GUNSALUS, STANIER und BINKLEY wiesen eine Cysteindesulfhydrase nach, die Cystein in H_2S, NH_3 und Pyruvat zerlegt, also eine Umkehrung der obigen Synthese bewirkt. Das Cystein seinerseits wird durch Reduktion der in den Polypeptidketten vorliegenden Aminosäure Cystin gebildet, wobei eine Hydrogenase tätig ist. (STEPHENSON 1949) Mit großer Wahrscheinlichkeit spielen sich bei Salmonellen und Citrobacter Freundii analoge Vorgänge ab. Man kann voraussetzen, daß die meisten Enterobacteriaceen die fermentativen Voraussetzungen für den Abbau von Cystein unter H_2S-Bildung besitzen. Die Untersuchungen von VAUGHN und LEVINE (1936) zeigen, daß dies auch für E. coli zutrifft, wenn nur ausreichende Mengen von Cystein zur Verfügung stehen. Dafür, daß Escherichia coli im Gegensatz zu Salmonellen und Citrobacter Freundii auf routinemäßigen H_2S-Nährböden trotz vorhandener Cysteindesulfhydrase keine H_2S-Bildung zeigt, wären zwei Erklärungen diskutabel:

1. Escherichia coli besitzt keine Fermente, um aus Polypeptiden Cystin abzuspalten. Der Cystinbedarf der Zelle wird durch eigene Synthese gedeckt (LAMPEN).

2. Die Fermente fehlen zwar nicht, haben aber so geringe Aktivität, daß die im Zwischenstoffwechsel entstehenden geringen Cystinmengen sogleich in zelleigenes Eiweiß eingebaut werden. Auf diese Weise stünde kein Cystin zum Abbau zur Verfügung; nur bei künstlichem Cystinzusatz im Überschuß kommt es zur H_2S-Bildung.

HALLMANN gibt an, daß das Vermögen, H_2S zu bilden, nicht allein von der Bakterienart, sondern in besonderem Maße von der Zusammensetzung des Nährsubstrates abhängig ist. Zusatz von z.B. Cystin begünstige die Schwefelwasserstoffbildung sehr. Zur genauen Untersuchung der vorhandenen bzw. fehlenden H_2S-Reaktion sind deshalb nur sorgfältig standardisierte Nährböden geeignet.

So steht die Frage: Bildet Escherichia coli auf routinemäßigen Nährböden - Bleiazetatagar und Eisengelatine nach KAUFFMANN - Schwefelwasserstoff? im Vordergrund. Sie besitzt deshalb großes Interesse, weil häufig geringe Schwärzungen auf H_2S-Nährböden auftreten und Unsicherheiten bei der Bewertung dieser Keime als Fäkalindikatoren die Folge sind.

G e s c h i c h t l i c h e s

Die Schwefelwasserstoffbildung war eine jener Stoffwechselleistungen der Bakterien, die sehr früh erkannt wurden. Schon Ende des vorigen Jahrhunderts findet man sie in der Fachliteratur beschrieben. Als Indikator für die H_2S-Bildung wurde in diesen Arbeiten Bleiazetatagar angegeben, das mit Schwefelwasserstoff nach folgender Formelgleichung reagiert:

$$H_2S + Pb(C_2H_3O_2)_2 \longrightarrow PbS + 2C_2H_4O_2$$

Der Nachweis erfolgte zunächst in Form des feuchten, mit Bleiazetatlösung getränkten Papierstreifens, der in die zu untersuchenden Röhrchen eingehängt wird und sich bei H_2S-Bildung bräunlich bis schwarz färbt (GAYON).

ORLOWSKI beschrieb 1895 die Schwärzung von Bleiazetat durch Schwefelwasserstoff bei Eberthella typhosa, nicht aber bei Escherichia coli. Eine wesentliche Neuerung brachten 1914 BURNET und WEISSENBACH, in dem sie ein Medium angaben - den B l e i a z e t a t a g a r -, das die Metallkomponente als Indikator bereits enthält und bei dem sich bei positiver H_2S-Reaktion der Nährboden entlang des Beimpfungsstiches schwarz färbt. In den darauffolgenden Jahren ging die Tendenz der Untersuchungen dahin, verschiedene Metallsalzgruppen für ihre Eignung als Indikatoren für den H_2S-Nachweis zu prüfen.

Folgende Metallsalzgruppen wurden untersucht:

1. Bleisalze:	JORDAN u. VICTORSON	1917
	KLIGLER	1917
	THOMPSON	1920-21
	MORRISON u. TANNER	1922
	TILLEY	1923
	BAILLEY u. LACEY	1927
	SPRAY	1936
	FRIEWER u. SHAUGNESSY	1944
2. Eisensalze:	MORRIS	1897
	WILSON	1922-23
	BECKWITH u. MOSER	1932
	LEVINE u. VAUGHN	1931-33
	EPSTEIN u. ANDERSON	1931-33
	ZOBELL u. FELTHAM	1934
	TITTSLER u. SANDHOLZER	1937
	SULCIN u. WILLET	1939-40
	HAJNA	1945
3. Wismut:	WILSON u. BLAIR	1927
	WILSON	1927 u.38
	PACHEO u. MELLO	1934
	HUNTER, FELDMANN u. CRECELIUS	1934 u.38
4. Nickel und Kobalt:	UTERMOHLEN u. GE RGI	1940
5. Mangan:	BECKWITH u. MOSER	1932
6. Cadmium:	KALLIO u. PORTER	1950

Diese Aufstellung umfaßt nur die wichtigsten Arbeiten und Metallsalzgruppen.

Die meisten Autoren empfehlen in ihren Veröffentlichungen, die Metallsalze den Nährböden direkt zuzusetzen. Doch gab es immer wieder Stimmen, die für die Nachweismethode mittels des Papierstreifens eintraten, da einige der Metallsalze, vor allem Bleisalze, eine wachstumshemmende und toxische Wirkung auf die Bakterien ausüben.

Parallel zu dieser Entwicklung, bessere Nachweisverfahren für die Schwefelwasserstoffbildung zu finden, liefen Untersuchungen, die sich damit beschäftigten, dem Nährboden schwefelhaltige Substanzen zuzusetzen, um so eine vermehrte H_2S-Bildung zu erreichen, die dann besser nachzuweisen ist.

Es wurden im wesentlichen beschrieben:

1. Thiosulfat:	TILLEY	1923
	TITTSLER u. SANDHOLZER	1937
	SULCIN u. WILLET	1939-40
	HAJNA	1945
2. Cystein:	PATRICK u. WERKMAN	1933
	UTERMOHLEN u. GEORGI	1940
3. Cystin:	STAGNITTA-BALISTERI	1893
	SEELIGER	1950
	KALLIO u. PORTER	1950

Auch hier wurden nur die wichtigsten Arbeiten erwähnt.

Mit dem intensiven Studium der Frage der Schwefelwasserstoffbildung bei coliformen Stämmen befaßte sich als erster LEVINE 1932. Er untersuchte verschiedene Metallsalzgruppen wie Blei, Eisen, Mangan und Nickel hinsichtlich ihrer Eignung als Indikatoren für die H_2S-Bildung bei Bakterien und gab ein nach seinen Ergebnissen als optimal befundenes Medium an:

2% Pepton, 1,5% Agar, 0,05% Eisencitrat, 0,1% K_2HPO_4

Mit diesem Nährboden als Nachweismethode glaubte er, die H_2S-Bildung zur Unterscheidung der Citrobacter von Escherichia coli und Aerobacter verwenden zu können. Er und sein Mitarbeiter VAUGHN griffen im Jahre 1936 diesen Gedanken erneut auf und führten umfangreiche Untersuchungen mit 229 Stämmen E. coli, 144 Stämmen Citrobacter und 299 Stämmen Aerobacter durch. Eine genaue biochemische Differenzierung der Keime wurde jedoch nicht angegeben.

Folgende Medien wurden verglichen:

1. LEVINE 1932 siehe oben

2.-4. PATRICK und WERKMAN 1933

2. Agar-Pepton-Medium mit 0,1% Cystein und 0,1% Glucose
3. dito ohne Glucose
4. dito ohne Glucose und ohne Pepton

5. DIGESTIVE FERMENTS COMPANY

Agar-Pepton-Medium mit Eisenammoniumcitrat (0,05%)

6.-7. ZOBELL und FELTHAM 1934

6. Agar-Pepton-Medium mit Eisenammoniumcitrat (0,05%)
7. dito mit Eisenazetat (0,03%)

Als Ergebnis fanden sie, daß praktisch alle E. coli und Citrobacter bei Cysteinzusatz Schwefelwasserstoff bilden, während 75% der Aerobacter diese Eigenschaft besitzen. Bei den Medien, die kein Cystein enthalten, fand man bei keinem der Aerobacter eine positive Reaktion. Bei den Citrobacter-Stämmen waren es etwa 50-60% (wahrscheinlich bedingt durch C. Freundii) und bei Escherichia coli zwischen 0,4 und 2,2% der Stämme, die eine H_2S-Bildung zeigten. Ferner stellten sie fest, daß in einem Medium, das Cystein enthält, der Peptongehalt keinen Einfluß hat, während mit der Verminderung des Agargehaltes die Häufigkeit der Stämme, die H_2S-positiv sind, zunimmt.

1937 gaben TITTSLER und SANDHOLZER einen Eisenpeptonagar an, der dem Bleiazetatagar vorzuziehen sei, denn die Schwärzung trete schneller auf und sei viel intensiver und daher besser zu erkennen. Bei Prüfung von verschiedenen Bakterienarten gelangten sie zu dem Ergebnis, daß Escherichia coli meist H_2S-negativ reagiere. Im Gegensatz dazu stehen die Resultate von HUNTER und Mitarbeiter, daß nämlich die gesamte Coligruppe Schwefelwasserstoff bilden könne, wenn nur ein geeignetes Medium vorhanden sei. Es gelang ihnen zu zeigen, daß bei 78 Stämmen E. coli lediglich 2 eine positive Reaktion auf Bleiazetatagar zeigten, während in einem Wismutmedium alle und bei einem Nachweis mit Wismutpapier 57 H_2S-Bildung zeigten. Mit insgesamt 75 Stämmen Citrobacter und Aerobacter erzielten sie ungefähr die gleichen Ergebnisse.

Nach dem zweiten Weltkrieg griffen KALLIO und PORTER die H_2S-Bildung wieder auf. Sie verwendeten einen Nährboden mit Cystinzusatz und Cadmiumazetat als Indikator. Als pH-Optimum gaben sie 7,2 - 7,4 bei Proteusarten an, während DESNUELLE und FROMANGEOT 1939 bei der Schwefelwasserstoffbildung von E. coli pH 6,4 vorgeschlagen hatten. Die Suche nach einem geeigneten Nährboden ging jedoch immer weiter. BADER und HOTZ empfahlen 1951 einen Eisen-Harnstoffagar, der eine Modifikation des Eisenagars nach KLIGLER darstellt und die gleichen Ergebnisse hinsichtlich der H_2S-Bildung wie dieser erzielte, und außerdem noch die Harnstoffreaktion erfaßte. Auch diese Autoren gaben den E. coli als H_2S-negativ an, obwohl sie vereinzelt doch positive Reaktionen bei E. coli sahen. Durch die Vielzahl der Metallsalze, die mit Schwefelwasserstoff unter Bildung eines farblich gut sichtbaren Sulfides reagieren, waren der Suche nach neuen Indikatoren keine Grenzen gesetzt. Doch erst der Zusatz von schwefelhaltigen Substanzen, hauptsächlich Cystein und Cystin, ergab meist eine hohe Quote der positiven Ausfälle bei Escherichia coli. So benützten BRISOU und MORAND 1952 Eisen-, Wismut-, Thallium- und Cadmiumsalze, um den Nachweis der H_2S-Bildung bei E. coli und Cysteinzusatz zu führen.

Im gleichen Jahre beschrieb KAUFFMANN einen Nährboden aus Fleischextrakt, Pepton und Gelatine mit einem Eisensalz als Indikator, mit dem er gleichzeitig H_2S-Bildung und Gelatineverflüssigung nachwies. Dieses Medium, die E i s e n g e l a t i n e , findet heute im Routinebetrieb zusammen mit Bleiazetatagar die häufigste Anwendung beim H_2S-Nachweis.

CLARKE setzte in seinen Untersuchungen 1953 dem Peptonnährboden Cystein, Natriumthiosulfat und Natriumsulfit zu und fand, daß die H_2S-Bildung aus Cystein nahezu immer vor sich geht, auch bei E. coli. Natriumthiosulfat erwies sich als weniger, Natriumsulfit als gänzlich ungeeignet. Wegen der toxischen Wirkung der Metallsalze zog er Bleiazetatpapier dem Bleiazetatagar beim Nachweis vor. Als pH-Optimum gibt CLARKE für E. coli pH 7,2-7,8 an. ARTMAN berichtete 1956 von der H_2S-Bildung aus Thiosulfat bei E. coli in Gegenwart von Azetaldehyd und Pyruvat. Bei Zugabe von Sulfiten und Sulfaten fand er durchwegs negative Resultate. Phosphate und Metallionen seien für die H_2S-Bildung wesentlich. pH-Optimum: pH 6,8. MOSSEL gibt 1960 nach einer Untersuchung von 85 Stämmen Enterobacteriaceen aus Nahrungsmitteln an, daß alle diese Stämme H_2S aus Cystein bilden.

ANDERSON und Mitarbeiter berichteten 1960 über den Einfluß von Glucose auf die Schwefelwasserstoffbildung bei Cysteinzusatz von E. coli. Einerseits beschleunigt Glucose die H_2S-Bildung, andererseits hemmt sie jedoch den Aufbau des Ferments, das das Cystein abbaut. Dieses Gleichgewicht werde vom Aminosäurengehalt des Mediums beeinflußt.

Um den erheblichen Aufwand im Rahmen einer Routinediagnostik zu beschränken, greifen PETERSEN und RUSTUM-ABU-GHAZALEH 1960 den Gedanken von COOK und PELCZAR auf, mehrere biochemische Leistungen mit einem Medium zu erfassen. Sie geben einen Phenolrotagar an, während sie die H_2S-Bildung mittels Bleiazetatpapier empfehlen.

Ausgangspunkt eigener Untersuchungen

Die Tendenz der Versuche über die H_2S-Bildung bei Enterobacteriaceen neigt in den letzten Jahren mehr zu stoffwechseltheoretischen Überlegungen. Zu diesem Zweck werden den Nährmedien schwefelhaltige Aminosäuren zugesetzt, um die H_2S-Bildung besser verfolgen zu können. Dadurch ist jedoch eine Differenzierungsmöglichkeit zwischen H_2S-positiven und H_2S-negativen Stämmen nicht mehr gegeben, da innerhalb der Coligruppe bei Zusatz dieser Substanzen nahezu alle Stämme positiv reagieren.

Bei der Routinediagnostik im Sinne der "Bunten Reihe" werden seit langer Zeit standardisierte Nährböden - hauptsächlich Bleiazetatagar, aber auch Eisengelatine nach KAUFFMANN - verwendet, um die H_2S-Bildung der Keime zu erfassen.

In der Fachliteratur sind keine genauen Angaben über Versuche mit coliformen Keimen in Bezug auf die H_2S-Reaktion bei diesen routinemäßigen Nährböden zu finden. In allen Arbeiten, die sich mit diesem Thema befassen, werden diese Keime - mit Ausnahme des sicher positiven Citrobacter Freundii - zwar als H_2S-negativ bezeichnet, doch wird immer betont, daß manchmal positive Ausfälle beobachtet werden. Dies und die Tatsache, daß auch in unserem Institut in der Routinediagnostik bei Verwendung von Bleiazetatagar zur Prüfung der

Schwefelwasserstoffreaktion hauptsächlich bei Escherichia coli in den letzten Jahren Unsicherheiten in der Beurteilung auftraten, waren der Anlaß zu folgenden Arbeiten. Das Bestreben der Untersuchungen geht keineswegs dahin, einen geeigneten, besseren Nährboden zu finden. Es soll vielmehr versucht werden, festzustellen, ob E. coli auf den routinemäßigen Nährböden H_2S bildet und unter welchen Bedingungen die echte oder schwach positive Reaktion zustandekommt, und von welchen Faktoren die Unsicherheitsquote abhängig ist.

A l l g e m e i n e M e t h o d i k

1. Nährböden:

Als Medium wurden 2 Nährböden untersucht :

a.) Bleiazetatagar

20 g Agar-Agar
10 g Pepton aus Fleisch (Merck)
3 g NaCl
2 g K_2HPO_4
1000 ccm verd. Fleischwasser

eingestellt auf pH 7,4
Vor dem Abfüllen zu 5 ccm Zugabe von 20 ccm einer 5%igen Bleidiazetatlösung.
Danach nicht mehr sterilisiert.

b.) Eisengelatine nach KAUFFMANN :

25 g Pepton aus Fleisch (Merck)

7,5 g Liebig Fleischextrakt

5 g NaCl

1000 ccm Aqua dest.

Autoklavieren (30 min. bei 1 at)

100 g gekörnte Gelatine

Einstellen auf pH 7,6 - Autoklavieren

Vor dem Abfüllen Zugabe von

5 ccm einer 10%igen $FeCl_2$-Lösung.

Danach nicht mehr sterilisiert.

2. Bebrütung:

Die Bebrütung erfolgte bei Bleiazetatagar im 37-Grad-Schrank, bei der Eisengelatine im 22-Grad-Schrank.

3. Ablesung:

Es wurde bei allen Versuchen der Reaktionseintritt (R.E.) festgestellt. Bei Bleiazetatagar wurde nach 6, nach 12, nach 24 und nach 48 Stunden abgelesen, bei Eisengelatine nur nach 12 und nach 24 Stunden, da nach 6 Stunden nie eine Reaktion zu sehen war und nach 48 Stunden lediglich eine verstärkte Wiederholung der Ergebnisse nach 24 Stunden.

4. Keimmaterial:

Als Keimmaterial wurden aus der Regnitz 210 coliforme Stämme isoliert und genau ausdifferenziert. Folgende biochemischen Leistungen der Keime wurden untersucht:

Lactose	Bulir (44Grad)	Nadi
Dextrose	Indol	Nitrat
Saccharose	Citrat	Methylrot
Sorbit	Urease	Gelatine
Adonit	Voges-Proskauer	
Inosit	H_2S mit	a.) Bleiazetatagar
		b.) Eisengelatine

Auf den nächsten sechs Seiten folgen die genauen biochemischen Reaktionen der einzelnen Keime in Tabellen. Nach dieser Differenzierung wurden gefunden:

91 Stämme Escherichia coli

57 Stämme	Fäkal-Coli	Indol	+
4 Stämme		Indol	-
30 Stämme	mit geringen Abweichungen		

61 Stämme Citrobacter

25 Stämme	Citrobacter intermedius
11 Stämme	Citrobacter Freundii
22 Stämme	mit geringen Abweichungen

3 Stämme waren auf Grund der H_2S-Reaktion weder bei C. intermedius noch bei C. Freundii einzuordnen, da sie auf Bleiazetatagar positive und auf Eisengelatine negative Reaktion zeigten.

39 Stämme Aerobacter

15 Stämme	Aerobacter cloacae
7 Stämme	Aerobacter aerogenes
16 Stämme	mit geringen Abweichungen

10 Stämme Aeromonas

9 Stämme nicht klassifizierbar

Schon hier zeigte sich, daß bei Bleiazetatagar uncharakteristische Schwärzungen auftraten, die man weder als positiv noch als negativ bezeichnen kann und eine genaue Differenzierung erschweren oder unmöglich machen.

Stamm	Nadi	Lac	Dex	Ser	Ado	Ino	Sacch	Bulir	Indol	VPR	Cit	MR	Urea	H_2S	Gel	Nitrat
1	-	++	++	++	-	-	++	++	+	+	+	-	+	-	+	+
2	-	++	++	++	-	-	++	-	-	+	+	-	+	-	+	+
3	-	++	++	++	-	-	++	-	-	+	+	-	+	-	+	+
4	-	++	++	++	+-	+-	++	-	-	+	+	-	+	-	-	+
5	-	++	++	++	+-	+-	++	+-	-	+	+	-	+	-	+	+
6	-	++	++	++	-	-	++	-	-	-	-	-	+	-	+	+
7	-	++	++	++	-	-	++	-	-	+	+	-	+	-	+	+
8	-	++	++	++	-	-	++	-	-	+	+	-	+	-	+	+
9	-	++	++	++	-	-	++	-	-	+	+	-	+	-	+	+
10	-	++	++	++	-	++	++	-	-	+	+	-	+	-	+	+
11	-	++	++	++	-	-	++	-	-	+	+	-	+	-	+	+
12	-	++	++	++	-	-	++	+-	-	+	+	-	+	-	-	+
13	-	++	++	++	-	-	++	-	-	+	+	-	+	-	+	+
14	-	++	++	++	-	-	++	-	-	+	+	-	+	-	+	+
15	-	++	++	++	-	-	++	-	-	+	+	-	+	-	+	+
16	-	++	++	++	++	-	++	+-	-	+	+	-	+	-	-	+
17	-	++	++	++	++	-	++	-	-	+	+	-	+	-	-	+
18	-	++	++	++	++	-	++	-	-	+	+	-	+	-	+	+
19	-	++	++	++	-	-	++	-	-	-	+	+	+	-	+	+
20	-	++	++	++	-	-	++	-	-	+	+	-	+	-	+	+
21	-	++	++	++	-	-	++	+-	-	-	+	+	+	-	+	+
22	-	++	++	++	-	-	++	-	-	+	+	-	+	-	-	+
23	-	++	++	++	++	-	++	-	-	+	+	-	+	-	-	+
24	-	++	++	++	++	-	++	-	-	+	+	-	+	-	-	+
25	-	++	++	++	-	-	++	-	-	+	+	-	+	-	+	+
26	-	++	++	++	-	-	++	-	-	+	+	-	-	-	+	+
27	-	++	++	++	-	-	++	-	-	+	+	-	+	-	+	+
28	-	++	++	++	++	-	++	-	-	+	+	-	+	-	-	+
29	-	++	++	++	++	-	++	-	-	+	+	-	+	-	-	+
30	-	++	++	++	++	-	++	-	-	+	+	-	+	-	-	+
31	-	++	++	++	-	-	++	-	-	+	+	-	-	-	-	+
32	-	++	++	++	++	++	++	+-	-	-	+	+	+	-	-	+
33	-	++	++	++	-	-	++	-	-	+	+	-	+	-	+	+
34	-	++	++	++	++	++	++	-	+	+	+	-	+	-	-	+
35	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	+	-	-	-	+
36	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Stamm	Nadi	Lac	Dex	Sor	Ado	Ino	Sacch	Bulir	Indol	VPR	Cit	MR	Urea	H_2S	Gel	Nitrat
37	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
38	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
39	-	++	++	++	-	-	++	++	+	+	+	-	+	-	-	+
40	+	++	++	++	-	-	++	-	+	+	+	-	-	-	-	+
41	-	++	++	++	-	-	-	++	-	-	-	+	-	-	-	+
42	+	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
43	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	+	-	-	-	+
44	+	++	++	++	-	-	+-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
45	+	++	++	++	-	-	++	-	+	-	-	+	-	-	+	-
46	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
47	-	++	++	++	-	++	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
48	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+(Fe-)	-	+
49	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	-	+	-	-	-	+
50	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
51	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
52	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
53	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-	+	+	-	-	-	+
54	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	+	+	-	+	-	+
55	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
56	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
57	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
58	-	++	++	++	++	++	++	-	+	-	+	+	-	-	-	+
59	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	+	+	-	+(Fe-)	-	+
60	-	++	++	++	-	-	++	-	-	-	+	+	-	+	-	+
61	-	++	++	++	-	-	++	-	-	-	+	+	-	+(Fe-)	-	+
62	-	++	++	++	++	-	-	++	+	-	+	+	+	+	-	+
63	-	++	++	++	++	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
64	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
65	+	++	++	-	-	-	++	-	+	-	-	+	-	-	+	+
66	-	++	++	++	-	-	++	+-	-	-	+	+	+	+	-	+
67	-	++	++	++	-	-	-	+-	-	-	+	+	-	+	-	+
68	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	+	-	-	+
69	-	++	++	++	++	++	++	-	+	-	+	+	+	-	-	+
70	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
71	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
72	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+

Stamm	Nadi	Lac	Dex	Sor	Ado	Ino	Sacch	Bulir	Indol	VPR	Cit	MR	Urea	H_2S	Gel	Nitrat
73	+	++	++	++	-	-	-	+-	-	-	+	+	-	-	-	+
74	-	++	+-	+-	-	-	+-	+-	+	-	-	+	-	-	-	+
75	-	++	++	++	-	-	++	+-	-	-	+	+	-	-	-	+
76	-	++	++	++	++	-	-	++	+	-	+	+	-	-	-	+
77	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	-	+	-	-	-	+
78	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	+	+	-	+	-	+
79	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	+	+	-	-	-	+
80	-	++	++	++	-	-	++	+-	-	+	+	-	-	-	-	+
81	-	++	++	++	-	-	++	++	+	+	+	-	-	-	-	+
82	-	++	++	++	++	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
83	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	+	+	-	-	-	+
84	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	-	+	-	-	-	+
85	-	+-	+-	+-	-	-	+-	+-	-	-	-	+	-	-	-	+
86	-	++	++	++	-	-	++	++	-	-	-	+	-	-	-	+
87	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	-	+	-	-	-	+
88	+	+-	+-	+-	-	-	+-	-	+	-	+	+	-	-	+	+
89	-	++	++	++	-	-	-	+-	-	-	+	+	-	+	-	+
90	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	-	+	-	-	-	+
91	-	++	++	++	++	-	-	++	+	-	+	+	-	-	-	+
92	-	++	++	++	-	-	++	+-	-	-	+	+	-	-	-	+
93	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	-	+	-	-	-	+
94	+	+-	+-	+-	-	-	+-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
95	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	-	+	-	-	-	+
96	-	++	++	++	-	++	++	+-	-	-	+	+	-	-	-	+
97	-	+-	+-	+-	++	-	+-	+-	+	-	-	+	-	-	-	+
98	-	++	++	++	-	-	++	+-	-	+	+	-	-	-	-	+
99	-	++	++	++	-	-	++	+-	-	-	+	+	-	-	-	+
100	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
101	-	++	++	++	-	-	++	-	+	-	-	+	-	-	+	+
102	-	++	++	++	-	-	+-	++	+	-	+	+	-	-	-	+
103	-	++	++	++	++	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
104	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
105	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	-	+	-	-	-	+

Stamm	Nadi	Lac	Dex	Ser	Ado	Ino	Sacch	Pulir	Indol	VPR	Cit	MR	Urea	H_2S	Gel	Nitrat
106	-	++	++	++	-	-	+-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
107	-	++	++	++	-	-	+-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
108	-	++	++	++	-	-	+-	++	+	-	+	+	-	-	-	+
109	-	++	++	++	-	-	++	+-	-	-	+	+	+	-	-	+
110	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
111	-	++	++	++	-	+-	++	+-	-	+	+	-	+	-	+	+
112	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	+	+	-	-	-	+
113	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	+	+	-	-	-	+
114	-	++	++	++	++	-	++	++	-	-	-	+	-	-	-	+
115	+	+-	+-	+-	-	+-	+-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
116	+	++	++	++	-	-	++	++	+	-	-	+	-	-	+	+
117	-	++	++	++	-	-	++	+-	-	+	+	-	-	-	+	+
118	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
119	-	++	++	++	-	-	+-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
120	-	++	++	++	-	-	+-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
121	-	++	++	++	++	-	+-	++	+	-	+	+	-	-	-	+
122	-	++	++	++	-	+-	++	+-	-	+	-	-	-	-	-	+
123	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	-	+	-	-	-	+
124	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	-	+	-	-	-	+
125	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	+	+	-	-	-	+
126	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	-	+	-	-	-	+
127	-	++	++	++	++	-	++	++	+	-	+	+	-	-	-	+
128	-	++	++	++	-	+-	++	++	+	+	+	+	+	-	-	+
129	-	++	++	++	-	-	+-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
130	-	++	++	++	++	-	++	++	+	-	+	+	-	-	-	+
131	-	++	++	++	-	++	++	+-	-	+	+	-	-	-	-	+
132	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	+	+	-	-	-	+
133	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	-	+	-	-	-	+
134	-	++	++	++	-	+-	++	+-	-	-	+	+	-	+	-	+
135	-	+-	+-	+-	-	-	+-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
136	-	+-	+-	+-	-	-	+-	+-	+	-	-	+	-	-	-	+
137	-	++	++	++	-	++	++	+-	-	+	+	-	-	-	-	+
138	-	++	++	++	-	-	++	+-	-	-	+	+	-	+	-	+

Stamm	Nadi	Lac	Dex	Sor	Ado	Ino	Sacch	Bulir	Indol	VPR	Cit	MR	Urea	H_2S	Gel	Nitrat
139	-	++	++	++	-	-	++	-	-	-	+	+	-	-	-	+
140	-	++	++	++	++	-	++	++	-	-	+	+	+	-	-	+
141	-	++	++	++	-	-	++	-	+	-	+	+	-	-	-	+
142	+	+-	+-	+-	-	-	+-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
143	-	++	++	++	++	++	++	-	-	+	+	+	+	-	-	+
144	-	++	++	++	-	-	++	-	+	-	+	+	-	-	+	+
145	-	++	++	++	++	+-	++	-	-	-	+	+	-	-	-	+
146	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
147	-	++	++	++	++	-	++	-	-	-	+	+	-	-	-	+
148	-	++	++	++	-	-	++	-	-	+	+	-	-	-	-	+
149	-	++	++	++	-	-	++	-	-	-	+	+	-	-	-	+
150	-	++	++	++	-	-	++	-	-	-	+	+	-	+	-	+
151	-	++	++	++	-	-	++	-	-	-	+	+	-	+	-	+
152	-	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
153	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	+	+	-	-	-	+
154	-	++	++	++	++	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
155	-	++	++	++	-	-	-	++	-	-	+	+	-	-	-	+
156	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	+	+	-	-	-	+
157	-	+-	+-	+-	-	-	-	+-	+	-	+	+	-	-	-	+
158	-	++	++	++	-	-	-	++	-	-	-	+	-	-	-	+
159	-	++	++	++	-	-	++	++	-	-	+	+	-	-	-	+
160	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
161	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
162	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	-	+	-	-	-	+
163	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
164	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
165	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
166	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
167	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	+	+	-	-	-	+
168	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
169	-	++	++	++	++	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
170	-	++	++	++	++	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
171	-	++	++	-	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
172	-	++	++	++	-	-	+	++	+	-	-	+	-	-	-	+
173	-	++	++	++	-	-	+	++	+	-	-	+	-	-	-	+
174	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+

Stamm	Nadi	Lac	Dex	Sor	Ado	Ino	Sacch	Bulir	Indol	VPR	Cit	MR	Urea	H_2S	Gel	Nitrat
175	-	+-	+-	-	-	-	+	+-	+	-	+	+	-	-	-	+
176	-	++	++	++	++	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
177	-	++	++	++	++	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
178	-	++	++	++	-	-	+	++	+	-	-	+	-	-	-	+
179	-	++	++	++	-	-	+	++	+	-	-	+	-	-	-	+
180	-	++	++	++	++	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
181	-	++	++	++	++	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
182	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
183	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
184	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	-	+	-	-	-	+
185	-	++	++	++	++	++	++	-	-	+	+	+	+	-	-	+
186	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	-	+	-	-	-	+
187	-	++	++	++	++	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
188	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	+	+	-	-	-	+
189	-	++	++	++	++	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
190	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
191	-	++	++	++	++	++	++	-	-	+	+	+	+	-	-	+
192	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
193	-	++	++	++	-	-	-	++	-	-	-	+	-	-	-	+
194	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	+	+	-	-	-	+
195	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	-	+	-	-	-	+
196	-	++	++	++	++	-	++	++	+	-	-	+	-	-	-	+
197	-	++	++	++	++	-	++	-	-	+	+	+	+	-	-	+
198	-	++	++	++	-	-	++	++	+	-	-	+	-	-	-	+
199	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	+	+	-	-	-	+
200	-	++	++	++	-	-	-	+-	+	-	+	+	-	-	-	+
201	-	+-	+-	-	++	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
202	-	++	++	++	++	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
203	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
204	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
205	-	++	++	++	++	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
206	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
207	-	++	++	++	++	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
208	-	++	++	++	++	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
209	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	+	-	-	-	+
210	-	++	++	++	-	-	-	++	+	-	+	+	-	-	-	+

Als Keimmaterial für die Versuche wurden ausgesucht:

3 Stämme E. coli, die auf Bleiazetatagar einen schwach positiven, uncharakteristischen Ausfall zeigten. Auf Eisengelatine waren diese Keime eindeutig negativ.
in den Tabellen Nr. 1 - 3

1 Stamm Citrobacter Freundii als Positivkontrolle
in den Tabellen Nr. 4

3 Stämme sicher H_2S-negative E. coli
in den Tabellen 5 - 7

1 Stamm Salmonella typhi murium als Positivkontrolle
in den Tabellen Nr. 8

Mit diesen 8 Stämmen wurde nach den Ursachen geforscht, die diese Unsicherheiten in der Ablesung bedingen und die eine genaue Differenzierung zwischen H_2S-positiven und H_2S-negativen Keimen illusorisch machen. Die uncharakteristischen Ausfälle werden in den Tabellen mit ± angegeben.

I. BLEIAZETATAGAR

1. Variation des Agar-Agar-Gehaltes:

Verdünnung eines 4%igen Fleischwasseragars mit Fleischwasserbouillon auf die Konzentrationen

4 % 3,5 % 3 % 2,5 % 2 % 1,5 % 1 %

Reaktionseintritt: Bei allen positiven Stämmen nach 5 - 7 Stunden.

6 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
1 %	-	-	-	+	-	-	-	+
1,5%	-	-	-	+	-	-	-	+
2 %	-	-	-	+	-	-	-	+
2,5%	-	-	-	+	-	-	-	+
3 %	-	-	-	+	-	-	-	+
3,5%	-	-	-	+	-	-	-	+
4 %	-	-	-	+	-	-	-	+

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
1 %	-	-	-	+	-	-	-	+
1,5 %	-	-	-	+	-	-	-	+
2 %	-	-	-	+	-	-	-	+
2,5 %	-	-	-	+	-	-	-	+
3 %	-	-	-	+	-	-	-	+
3,5 %	-	-	-	+	-	-	-	+
4 %	-	-	-	+	-	-	-	+

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
1 %	-	-	-	+	±	-	-	+
1,5 %	-	-	-	+	-	-	-	+
2 %	-	-	-	+	-	-	±	+
2,5 %	±	-	-	+	-	-	-	+
3 %	-	-	±	+	-	-	-	+
3,5 %	-	-	-	+	-	-	±	+
4 %	-	-	±	+	-	-	-	+

48 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
1 %	-	-	-	+	±	-	±	+
1,5 %	-	±	-	+	±	-	±	+
2 %	±	-	-	+	-	±	±	+
2,5 %	±	-	-	+	±	-	-	+
3 %	-	±	±	+	-	±	-	+
3,5 %	-	-	-	+	-	-	±	+
4 %	-	-	±	+	-	-	-	+

LEVINE und VAUGHN hatten 1936 festgestellt, daß der Agar-Agar-Gehalt eine große Rolle spielen würde. Sie gaben an, daß mit fallender Agar-Agar-Konzentration die positiven Reaktionsausfälle bei Escherichia coli zunehmen würden. Bei einer Bouillon (Agar-Agar-Gehalt 0%) erzielten sie einen hohen Prozentsatz an positiven Ergebnissen.
So wurde der Versuch mit folgenden Konzentrationen nochmals durchgeführt:

0 % 0,3 % 0,5 % 0,7 % 1 % 2 %

Reaktionseintritt: Bei allen positiven Stämmen nach 5 - 7 Stunden.

6 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0 %	-	-	-	+	-	-	±	+
0,3 %	-	±	-	+	-	-	-	+
0,5 %	-	-	-	+	-	±	-	+
0,7 %	-	-	-	+	-	-	-	+
1 %	-	-	-	+	-	-	-	+
2 %	-	-	-	+	-	-	-	+

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0 %	-	-	-	+	-	-	±	+
0,3 %	-	±	-	+	-	-	-	+
0,5 %	±	-	-	+	±	±	±	+
0,7 %	-	±	-	+	-	±	-	+
1 %	-	-	±	+	-	-	-	+
2 %	-	±	-	+	±	-	-	+

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0 %	-	-	-	+	-	-	±	+
0,3 %	-	±	-	+	-	-	-	+
0,5 %	±	-	±	+	±	±	±	+
0,7 %	-	±	-	+	-	±	-	+
1 %	-	-	±	+	±	-	-	+
2 %	-	±	-	+	±	-	-	+

48 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0 %	-	-	±	+	±	-	±	+
0,3 %	-	±	-	+	-	±	-	+
0,5 %	±	-	±	+	±	±	±	+
0,7 %	-	±	-	+	-	±	-	+
1 %	±	-	±	+	±	-	-	+
2 %	-	±	±	+	±	±	±	+

Ergebnis:

Weder im zeitlichen Eintritt noch in der Intensität der Schwärzung sind bei den H_2S-positiven Stämmen Unterschiede festzustellen. Der Agar-Agar-Gehalt spielt demnach keine Rolle.

Bei beiden Versuchen wurden die eingangs erwähnten uncharakteristischen Reaktionsausfälle bei den E. coli-Stämmen bemerkt. Wie aus der Abb. 1 ersichtlich, ist es recht schwierig, diese Reaktionen als positiv oder negativ zu bezeichnen.

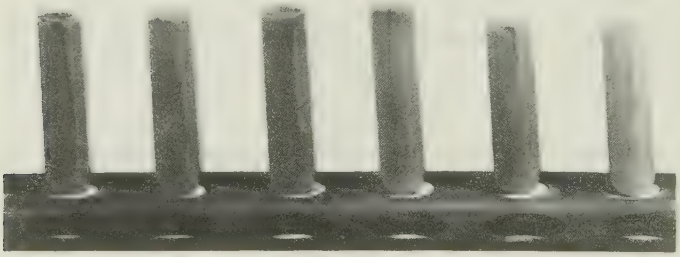

Abb. 1 Uncharakteristische Ausfälle
E. coli nach 48 Stunden

Während bei der ersten Versuchsreihe ein 4%iger Agar (hergestellt in einer Menge von einem Liter) verdünnt wurde, wurden im zweiten Fall die einzelnen Chargen zu 50 ccm hergestellt. Im zweiten Fall traten wesentlich mehr uncharakteristische Ausfälle auf und zwar bei allen sechs E. coli-Stämmen.

2. Variation des pH-Wertes:

Routinemäßiger Fleischwasseragar mit n-NaOH bzw. N-HCl eingestellt auf

pH 6 pH 6,5 pH 7 pH 7,5 pH 8

Reaktionseintritt: Nach 6 Std. pH 7 pH 7,5 pH 8
nach 9 Std. pH 6,5
nach 24 Std. pH 6 sehr schwach

6 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
6	-	-	-	-	-	-	-	-
6,5	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	+	-	-	-	+
7,5	-	-	-	+	-	-	-	+
8	-	-	-	+	-	-	-	+

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
6	-	-	-	-	-	-	-	-
6,5	-	-	-	+	-	-	-	+
7	-	-	-	+	-	-	-	+
7,5	-	-	-	+	-	-	-	+
8	-	-	-	+	-	-	-	+

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
6	-	-	-	+	-	-	-	+
6,5	-	-	-	+	-	-	-	+
7	-	-	-	+	-	-	-	+
7,5	-	-	-	+	-	-	-	+
8	-	-	-	+	-	-	-	+

48 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
6	-	-	-	+	-	-	-	+
6,5	-	±	-	+	-	-	-	+
7	-	±	-	+	-	-	±	+
7,5	±	-	±	+	-	±	-	+
8	-	±	±	+	±	-	-	+

Ergebnis:

Saurer pH-Wert, d.h. unter 6,5 hemmt bei den positiven Keimen die Schwärzung des Mediums. Die Intensität der Schwärzung ist nach 24 Stunden gleich mit Ausnahme von pH 6, bei dem die Reaktion auch später nur sehr schwach zu sehen ist. Als Optimum ergibt sich pH 7-8. Allerdings treten in diesem Bereich auch die meisten uncharakteristischen Ausfälle auf.

Ausschluß lokaler Säuerung:

Verwendung von Bleiazetatagar, der mit $\frac{m}{15}$ - Phosphatpuffer (SÖRENSEN) gepuffert ist auf

pH 6,5 pH 7 pH 7,5

um den Ausschluß lokaler Säuerung unter der an der Oberfläche üppig wachsenden Colistichkultur zu erreichen.

Reaktionseintritt: nach 6 Std. pH 7 und pH 7,5
nach 15 - 20 Std. pH 6,5

6 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
6,5	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	+	-	-	-	+
7,5	-	-	-	+	-	-	-	+

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
6,5	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	+	-	-	-	+
7,5	-	-	-	+	-	-	-	+

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
6,5	-	-	-	+	-	-	-	+
7	-	-	-	+	-	±	-	+
7,5	-	-	-	+	-	-	-	+

48 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
6,5	-	-	-	+	-	-	-	+
7	-	±	±	+	-	±	-	+
7,5	±	-	±	+	±	-	-	+

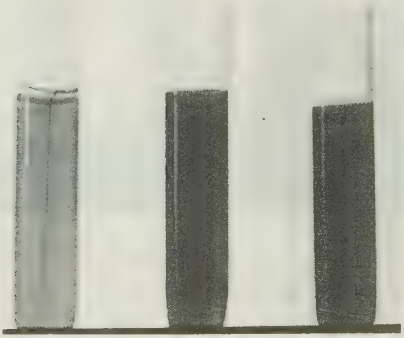

Abb. 2 v.l. pH 6,5 pH 7 pH 7,5 Citrobacter Freundii 24 Std.

Ergebnis: siehe auch Abb. 2

pH-Optimum liegt bei pH 7 - 7,5. Bei pH 6,5 tritt die Reaktion verzögert ein und bleibt immer nur sehr schwach. Die indifferenten Ausfälle sind bei pH 7 - 7,5 häufiger.

3. Variation des Peptongehaltes (Pepton aus Fleisch)

Dieser Versuch wurde auf 2 verschiedene Arten durchgeführt; und zwar wurden zunächst Chargen zu 50 ccm hergestellt und danach Chargen zu einem Liter.

a.) Chargen zu 50 ccm

Peptongehalt: 0,1 % 0,25 % 0,5 % 1 % 1,5 % 2 %

Reaktionseintritt: Bei allen positiven nach 5 - 7 Stunden.

6 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25%	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-
1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
1,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-
2 %	-	-	-	-	-	-	-	-

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25%	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 %	-	-	-	-	-	-	-	+
1 %	±	±	-	+	-	±	-	+
1,5 %	±	±	-	+	±	-	-	+
2 %	-	±	-	+	-	±	±	+

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 %	-	-	±	+	-	-	-	+
0,25%	-	-	-	+	-	±	-	+
0,5 %	±	-	-	+	-	-	±	+
1 %	±	±	-	+	-	±	-	+
1,5 %	±	±	-	+	±	±	-	+
2 %	-	±	-	+	-	±	±	+

48 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 %	-	-	±	+	-	-	-	+
0,25%	-	±	-	+	-	±	±	+
0,5 %	±	±	±	+	±	±	±	+
1 %	±	±	-	+	-	±	±	+
1,5 %	±	±	±	+	±	±	±	+
2 %	±	±	±	+	±	±	±	+

Ergebnis: siehe auch Abb. 3

Bei den H_2S-positiven Keimen steigt die Intensität der Schwärzung mit dem Peptongehalt des Mediums. Bei den sechs E. coli-Stämmen ist das Ergebnis sehr ungenau. Die uncharakteristischen Ausfälle häufen sich, man findet schon nach 6 und 12 Stunden solche Reaktionsausfälle.

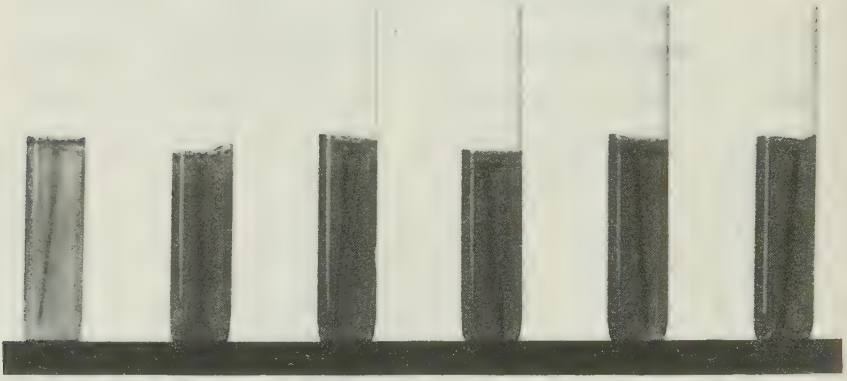

Abb. 3 Variation des Peptongehaltes (Pepton aus Fleisch)

v.l. o,1 % 0,25 % 0,5 % 1 % 1,5 % 2 %

Citrobacter Freundii 24 Stunden

b.) Chargen zu einem Liter:

Peptongehalt wie im letzten Versuch

Reaktionseintritt: nach 9 Stunden bei 1 % 1,5 % 2 %

nach 18 - 20 Stunden bei den übrigen.

6 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25%	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-
1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
1,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-
2 %	-	-	-	-	-	-	-	-

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25%	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-
1 %	-	-	-	+	-	-	-	+
1,5 %	-	-	-	+	-	-	-	+
2 %	-	-	-	+	-	-	-	+

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,25%	-	-	-	+	-	±	-	+
0,5 %	-	-	-	+	-	-	-	+
1 %	±	±	±	+	-	±	-	+
1,5 %	±	±	-	+	-	-	-	+
2 %	±	±	±	+	-	±	±	+

48 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 %	-	±	-	+	-	-	-	+
0,25%	±	-	-	+	-	±	-	+
0,5 %	-	-	-	+	-	-	-	+
1 %	±	±	±	+	-	±	-	+
1,5 %	±	±	-	+	-	-	±	+
2 %	±	±	±	+	±	±	±	+

Ergebnis:

Der verzögerte Reaktionseintritt erklärt sich daraus, daß zu diesem Versuch eine neue Charge Bleiazetat verwendet wurde, da der Versuch erst zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt wurde. Diese Erscheinung wird später genauer erläutert. Bei den positiven Keimen stimmt das Resultat mit dem bei a.) überein. Es wurden jedoch weitaus weniger schwach positive Ausfälle bei E. coli beobachtet. Bei den Chargen zu 50 ccm sind die Ergebnisse nicht verwendbar, da die Komponenten in zu geringer Menge vorhanden sind und mehr Bodensatz, dessen Wirkung später genau untersucht wird, ausfällt.

4. Variation der Peptonart:

Herstellung von Chargen zu einem Liter. Verwendung der neuen Charge Bleiazetat.

Peptonarten:	Pepton aus Fleisch	(Merck)	- Fl
	Bacto-Pepton	(Difco)	- Bac
	Pepton aus Casein	(Merck)	- Cas
	Proteose Pepton	(Difco)	- Dif
	Witte-Pepton		- Wi

Reaktionseintritt:	nach 4 Stunden	Proteose Pepton
	nach 6 Stunden	Witte-Pepton
	nach 9 Stunden	Pepton aus Fleisch
	nach 20 Stunden	die übrigen

6 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
Fl	-	-	-	+	-	-	-	+
Bac	-	-	-	-	-	-	-	-
Cas	-	-	-	-	-	-	-	-
Dif	-	-	-	-	-	-	-	-
Wi	-	-	-	+	-	-	-	-

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
Fl	-	±	-	+	-	-	-	+
Bac	-	-	-	-	-	-	-	-
Cas	-	-	-	-	-	-	-	-
Dif	-	-	-	+	-	-	-	+
Wi	-	-	-	+	-	-	-	+

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
Fl	±	±	-	+	-	±	-	+
Bac	-	±	-	+	±	-	-	+
Cas	-	±	-	+	-	±	-	+
Dif	-	-	±	+	-	-	-	+
Wi	-	±	-	+	-	-	-	+

48 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
Fl	±	±	-	+	-	±	-	+
Bac	±	±	-	+	±	±	-	+
Cas	-	±	-	+	-	±	-	+
Dif	-	-	±	+	-	±	-	+
Wi	-	±	-	+	±	±	-	+

Ergebnis: siehe auch Abb. 4

Bei den H_2S-positiven Keimen geben Proteose Pepton und Witte-Pepton einen zeitlich früheren und viel intensiveren Ausfall der Reaktion als die übrigen Arten. Man kann folgende Reihenfolge in der Stärke der Schwärzung erkennen:

Proteose Pepton, Witte-P., Fleisch-P., Bacto-P., Casein-P.

Bei den stärksten H_2S-bildenden Arten waren auch die indifferenten Ausfälle am häufigsten.
Auch hier waren zunächst Chargen zu 50 ccm verwendet worden, die sich auch bei diesem Versuch als ungeeignet erwiesen, da der Prozentsatz der schwach positiven Ausfälle uncharakteristischer Art zu hoch war.

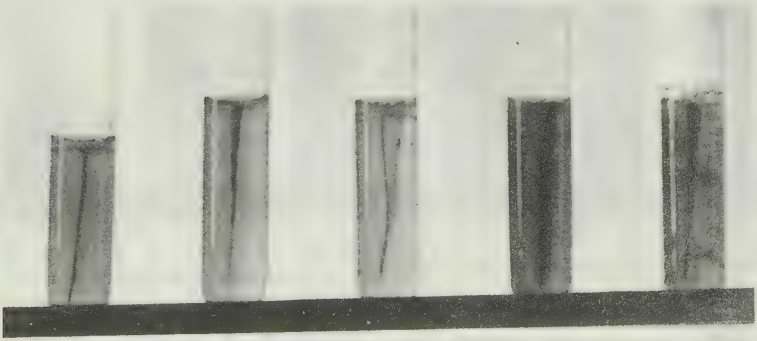

Abb. 4 Variation der Peptonart
v.l. Fleisch-P., Bacto-P., Casein-P., Proteose-P., Witte-P., Citrobacter Freundii 24 Std.

5. Dextrosezusatz

Entsprechende Verdünnung eines Fleischwasseragars, der 0,1 % Dextrose enthält, mit normalem Fleischwasseragar auf folgende Konzentrationen:

0,003 % 0,006 % 0,012 % 0,025 % 0,05 % 0,1 %

Reaktionseintritt: nach 6 Stunden 0,003 % und 0,006 %
schwach 0,012 % und 0,025 %
nach 12 Stunden 0,05 %
nach 24 Stunden 0,1 %

6 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,003%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,006%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,012%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,025%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,05 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,003%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,006%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,012%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,025%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,05 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,003%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,006%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,012%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,025%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,05 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,1 %	-	-	-	+	-	-	-	+

48 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,003%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,006%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,012%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,025%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,05 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,1 %	-	-	-	+	-	-	-	+

Ergebnis: siehe auch Abb. 5

Bei den positiven Keimen ist der Ausfall der Schwärzung geringer als normal. Mit zunehmender Glucosekonzentration tritt daneben noch eine zeitliche Verzögerung der Reaktion ein. Dadurch wurden bei den sechs E.coli-Stämmen in keinem Fall eine Schwärzung festgestellt, auch nicht nach 48 Stunden. Allerdings ist der Ausfall der Schwärzung bei den positiven Keimen nur sehr schwach, sodaß unter Umständen Stämme, die nur sehr wenig H_2S bilden können, nicht erfaßt werden.

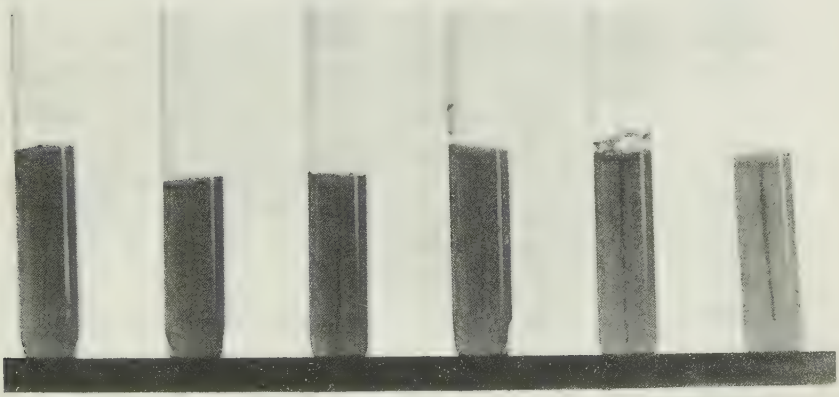

Abb. 5 Dextrosezusatz
v.l. 0,1 % 0,05 % 0,025 % 0,012 % 0,006 % 0,003 %
Citrobacter Freundii 48 Stunden

Als Ergänzung zu dem oben beschriebenen Versuch wurde mit denselben Konzentrationen Glucose ein Fleischwasseragar verwendet, bei dem das Pepton aus Fleisch durch Difco-Proteose-Pepton ersetzt war.

Diese Peptonart erwies sich ja augenscheinlich als die Art, die die H_2S-Bildung am meisten fördert.

Herstellung der einzelnen Chargen wie beim vorigen Versuch.

6 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,003%	-	-	-	-	-	-	-	-
0,006%	-	-	-	-	-	-	-	-
0,012%	-	-	-	-	-	-	-	-
0,025%	-	-	-	-	-	-	-	-
0,05 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,003%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,006%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,012%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,025%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,05 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,003%	±	-	±	+	-	±	-	+
0,006%	-	-	-	+	±	-	-	+
0,012%	-	±	-	+	-	-	+	+
0,025%	-	-	-	+	-	-	±	+
0,05 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,1 %	-	-	-	+	-	-	-	+

48 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,003%	±	-	±	+	-	±	-	+
0,006%	±	-	±	+	±	-	-	+
0,012%	-	±	-	+	-	±	±	+
0,025%	-	-	-	+	-	-	±	+
0,05 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,1 %	-	-	-	+	-	-	-	+

Ergebnis:

Auch hier trat durch Glucosezusatz eine Hemmung der Schwärzung auf. Sie war jedoch in diesem Fall nicht so ausgeprägt wie in dem Versuch mit Pepton aus Fleisch, da Proteose-Pepton als Komponente stärker wirksam ist. Die positiven Ausfälle waren intensiver und es traten auch einige uncharakteristische Reaktionen bei Escherichia coli auf.

6. Zusatz von Brentraubensäureester

Zusatz des Esters der Brenztraubensäure und der Natronlauge in den Konzentrationen

0,1 % 0,5 % 1 % zum normalen Bleiazetatagar

6 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-
1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
normal	-	-	-	-	-	-	-	-

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,5 %	-	-	-	+	-	-	-	+
1 %	-	-	-	+	-	-	-	+
normal	-	-	-	+	-	-	-	+

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,5 %	-	±	-	+	-	-	-	+
1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
normal	-	-	-	+	-	±	-	+

48 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
o,1 %	±	-	±	+	-	±	-	+
0,5 %	-	±	-	+	-	-	-	+
1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
normal	-	±	±	+	-	±	-	+

Ergebnis:

Der Ester der Brenztraubensäure und der Natronlauge (Natriumpyruvat) von einer Konzentration von 0,5 % aufwärts hemmt die H_2S-Bildung sehr stark. Selbst bei den positiven Keimen ist nach 48 Stunden keine Schwärzung zu sehen. Eine Konzentration von 0,1 % hat keinen Einfluß auf die H_2S-Bildung.

7. Variation der Fleischwasserkonzentration

Eine sehr variable Komponente bei der Herstellung des routinemäßigen Fleischwasseragars stellt das Fleischwasser dar. Die Qualität des Fleischwassers wird durch die Beschaffenheit des zu verarbeitenden Fleisches bestimmt, die nie die gleiche ist. Auch bei Verwendung von Liebig-Fleischextrakt wird dieses Manko nicht ausgeschaltet, wie ein entsprechender Versuch zeigt. Andererseits wird das Fleischwasser nach der Herstellung im Routinebetrieb nicht immer gleichmäßig verdünnt. Zwar gibt HALLMANN an, daß das zerkleinerte Fleisch mit der doppelten Gewichtsmenge Wasser übergossen wird und eine halbe Stunde gekocht wird. Nach dem Filtrieren soll das endgültige Filtrat auf das ursprüngliche Volumen mit aqua dest. aufgefüllt werden. Bei ungenauem Befolgen der Vorschrift, wie z.B. zu langes Kochen, erreicht man dann eine verschiedene Verdünnung des Fleischwassers.

Zur Untersuchung dieses Problems wurden im Parallelversuch verglichen:

a.) Chargen, bei denen das Fleischwasser normal 4:1 zugunsten des Fleischwassers verdünnt wurde.

b.) Chargen, bei denen das Fleischwasser 1:1 verdünnt wurde

c.) Chargen, bei denen zwar das Fleischwasser 1:1 verdünnt wurde, die aber außerdem je 0,008 % Glucose, Fructose und Inosit enthalten.

Tabellen zu a.) siehe unter"Variation der Peptonart"

Tabellen zu b.):

Reaktionseintritt: nach 10 Stunden Proteose-Pepton
nach 12 Stunden Witte-Pepton
nach 15 Stunden Pepton aus Fleisch
die beiden anderen bleiben negativ

6 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
Fl	-	-	-	-	-	-	-	-
Bac	-	-	-	-	-	-	-	-
Cas	-	-	-	-	-	-	-	-
Dif	-	-	-	-	-	-	-	-
Wi	-	-	-	-	-	-	-	-

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
Fl	-	-	-	-	-	-	-	-
Bac	-	-	-	-	-	-	-	-
Cas	-	-	-	-	-	-	-	-
Dif	-	-	-	+	-	-	-	-
Wi	-	-	-	+	-	-	-	-

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
Fl	-	-	-	+	-	-	-	-
Bac	-	-	-	-	-	-	-	-
Cas	-	-	-	-	-	-	-	-
Dif	-	-	-	+	-	-	-	-
Wi	-	-	-	+	-	-	-	+

48 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
Fl	-	±	-	+	-	±	-	+
Bac	-	-	-	-	-	-	-	-
Cas	-	-	-	-	-	-	-	-
Dif	-	-	-	+	-	±	-	+
Wi	±	±	-	+	±	-	±	+

Tabellen zu c.) :

Reaktionseintritt: nach 8 Stunden Proteose-Pepton
nach 10 Stunden Witte-Pepton
nach 12 Stunden Pepton aus Fleisch
nach etwa 20 Stunden Casein- und Bacto-Pepton

6 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
Fl	-	-	-	-	-	-	-	-
Bac	-	-	-	-	-	-	-	-
Cas	-	-	-	-	-	-	-	-
Dif	-	-	-	-	-	-	-	-
Wi	-	-	-	-	-	-	-	-

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
Fl	-	±	-	+	-	-	-	+
Bac	-	-	-	-	-	-	-	-
Cas	-	-	-	-	-	-	-	-
Dif	-	-	-	+	-	-	-	+
Wi	-	±	-	+	±	-	±	+

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
Fl	±	±	-	+	-	±	±	+
Bac	-	-	-	+	-	-	-	-
Cas	-	-	-	+	-	-	-	-
Dif	-	±	-	+	-	-	-	+
Wi	-	±	-	+	±	±	±	+

48 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
Fl	±	±	±	+	-	±	±	+
Bac	-	±	-	+	-	±	-	+
Cas	-	-	-	+	-	-	-	+
Dif	-	+	+	+	-	-	-	+
Wi	±	±	±	+	±	±	±	+

Ergebnis: siehe auch Abb. 6
Beim Vergleich sieht man, daß die Verdünnung eine Rolle spielt. Bei zu großer Verdünnung kommt infolge des verminderten Wachstums der Keime nur eine schwache H_2S-Bildung zustande. Durch Zugabe von wachstumsfördernden Zuckern kann ein Ausgleich erzielt werden. Daraus folgt, daß die Verdünnung des Fleischwassers die Brauchbarkeit des Bleiazetatagars zum H_2S-Nachweis beeinflußt.

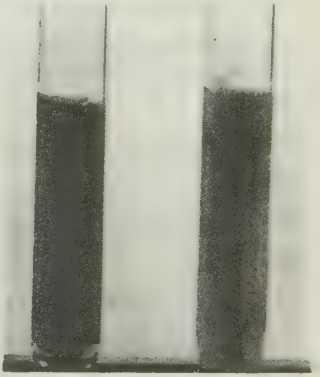

Abb. 6 Verdünnung des Fleischwassers
l. ohne Zucker 1:1
r. mit je 0,008% 1:1

C. Freundii 24 Std. Glucose Fructose Inosit

8. Einfluß des Bodensatzes auf die H_2S-Bildung

Wie bei der Variation des Agar-Agar-Gehaltes, des Peptongehaltes und der Peptonart festgestellt wurde, sind Chargen von Fleischwasseragar, die in einer Menge von 50 ccm hergestellt werden, zum Nachweis der H_2S-Bildung ungeeignet. Die einzelnen Komponenten, die nicht immer ganz genormt sind, werden in zu kleinen Mengen den Chargen zugesetzt, sodaß sich beim Autoklavieren unkontrollierbare Vorgänge abspielen können. Es fiel vor allem auf, daß bei den Chargen zu 50 ccm eine größere Menge von Bodensatz ausfällt, als bei den Chargen zu einem Liter. Dieser Bodensatz geht dem Agar durch das Dekantieren verloren. Da andererseits bei diesen dekantierten Chargen zu 50 ccm die H_2S-Bildung - vor allem bei den uncharakteristischen Ausfällen bei Escherichia coli (siehe Ergebnistabellen unter Agar-Agar-Variation und Peptonvariation) zu beobachten - gegenüber den Chargen zu einem Liter forciert und gesteigert ist, liegt ein Zusammenhang zwischen Bodensatz und H_2S-Bildung nahe.

Ein Probeversuch ergab, daß bei 50 ccm-Chargen, die nicht dekantiert wurden, also den Bodensatz enthielten, die H_2S-Bildung gehemmt wurde. Daraus wurde geschlossen, daß im Bodensatz Stoffe vorhanden sein müssen, die eine Schwefelwasserstoffbildung unterdrücken können.

Eine qualitative und quantitative Untersuchung des Bodensatzes ergab, daß er hauptsächlich Calzium- und Magnesiumsalze enthält (SELENKA 1958). Da die Menge des Bodensatzes neben der Menge,

in denen der Agar hergestellt wird, auch noch vom pH-Wert abhängig ist, ergibt sich folgendes Ergebnis:

pH-Wert	Calziumgehalt	Magnesiumgehalt
6,5	120 mg/l	72 mg/l
7	630 mg/l	189 mg/l
7,5	1015 mg/l	870 mg/l
8	1320 mg/l	1188 mg/l

Der quantitative Nachweis wurde mit der Titriplex-Methode durchgeführt. Der Bodensatz wurde in Wasser gelöst und das Calzium unter Verwendung von Calconcarbonsäure als Indikator mit Titriplex-III-Lösung titriert. Danach Zugabe von Perhydrol bis zum Verschwinden der Farbe. Zugabe von Ammoniaklösung und einer Puffertablette (Merck). Titration des Magnesiums mit Titriplex-III-Lösung.

Um die Rolle des Bodensatzes bei der H_2S-Bildung näher zu untersuchen, wurden - zunächst mit der früher angegebenen Peptongehalt-Variation - Chargen zu einem Liter hergestellt. Diese wurden vorsichtig dekantiert, bis im Literkolben nur noch ein Rest von 100 ccm verblieb, der nun den gesamten Bodensatz enthielt.

Im Parallelversuch wurden verglichen:

a.) Chargen ohne Bodensatz zu 50 ccm und zu einem Liter
Ergebnistabellen siehe unter 3a und 3b

b.) Chargen mit Bodensatz unter Verwendung des oben erwähnten Restes von 100 ccm

c.) Chargen ohne Bodensatz, die aber einen Zusatz von je 0,1 % $CaCl_2$ und 0,1 % $MgCl_2$ enthalten.

Tabellen zu b.)

Reaktionseintritt: nach 12 Stunden 1,5 % und 2 %
nach 35-40 Stunden 0,5 % und 1 %
alle anderen nicht positiv

6 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25%	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-
1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
1,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-
2 %	-	-	-	-	-	-	-	-

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25%	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-
1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
1,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-
2 %	-	-	-	-	-	-	-	-

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25%	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-
1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
1,5 %	-	-	-	+	-	-	-	+
2 %	-	-	-	+	-	-	-	+

48 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25%	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 %	-	-	-	+	-	-	-	-
1	-	-	-	+	-	-	-	+
1,5 %	±	±	-	+	±	±	±	+
2 %	±	±	-	+	±	±	±	+

Tabellen zu c.)

Reaktionseintritt: nach 20-24 Stunden 0,5 % bis 2 %
alle anderen bleiben negativ

6 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25%	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-
1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
1,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-
2 %	-	-	-	-	-	-	-	-

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25%	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-
1 %	-	-	-	+	-	-	-	-
1,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-
2 %	-	-	-	-	-	-	-	-

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25%	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 %	-	-	-	+	-	-	-	-
1 %	±	-	-	+	-	-	-	+
1,5 %	-	-	-	+	-	-	-	+
2 %	-	-	-	+	-	-	-	+

48 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25%	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5 %	-	-	-	+	-	-	-	-
1 %	±	-	-	+	-	-	-	+
1,5 %	-	±	-	+	-	±	-	+
2 %	-	-	-	+	-	-	-	+

Ergebnis: siehe auch Abb. 7 und 8

Der Bodensatz hat einen entscheidenden Einfluß auf die H_2S-Bildung infolge seines Ca- und Mg-Gehaltes. Durch das Dekantieren werden diese Salze aus dem Agar entfernt. Dadurch wird die Schwefelwasserstoffbildung möglich. Bei der Verwendung von 1 Liter-Chargen sind die Verhältnisse relativ günstig. Bei 50 ccm-Chargen gehen dem Medium durch vermehrte Bodensatzbildung zuviel Salze verloren, sodaß sich vor allem die uncharakteristischen Ausfälle bei E. coli häufen, und der Bleiazetatagar nicht mehr zu verwenden ist.

Dekantiert man nicht ab, so tritt eine Hemmung der H_2S-Bildung auf, ebenso bei Zugabe von Ca- und Mg-salzen, sodaß diese Salze die wirksamen Komponenten im Bodensatz darstellen. In der Routine wird oft dem Dekantieren nicht die nötige Sorgfalt geschenkt. Außerdem muß beachtet werden, daß die Menge des entstehenden Bodensatzes von der Größe der Charge und dem pH-Wert abhängig ist.

Der gleiche Parallelversuch wurde mit der Peptonvariation durchgeführt.

Ergebnis: siehe auch Abb. 9

Reaktionseintritt:	mit Bodensatz	mit $CaCl_2$ u. $MgCl_2$
Fleisch - P.	12 Stunden	12 Stunden
Bacto-P.u.Casein-P.	nie	nie
Proteose-P.	9 Stunden	10 Stunden
Witte-P.	11 Stunden	11 Stunden

Diese Ergebnisse stimmen in etwa mit den vorigen überein.

Tabellen mit Bodensatz:

6 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
Fl	-	-	-	-	-	-	-	-
Bac	-	-	-	-	-	-	-	-
Cas	-	-	-	-	-	-	-	-
Dif	-	-	-	-	-	-	-	-
Wi	-	-	-	-	-	-	-	-

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
Fl	-	-	-	+	-	-	-	+
Bac	-	-	-	-	-	-	-	-
Cas	-	-	-	-	-	-	-	-
Dif	-	-	-	+	-	-	-	+
Wi	-	-	-	+	-	-	-	+

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
Fl	-	-	-	+	-	-	-	+
Bac	-	-	-	-	-	-	-	-
Cas	-	-	-	-	-	-	-	-
Dif	-	-	-	+	-	-	-	+
Wi	-	-	-	+	-	-	-	+

48 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
Fl	-	-	-	+	-	-	-	+
Bac	-	-	-	-	-	-	-	-
Cas	-	-	-	-	-	-	-	-
Difm	-	-	-	+	-	-	-	+
Wi	±	-	±	+	±	±	±	+

Tabellen mit 0,1 % $CaCl_2$ und $MgCl_2$:

6 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
Fl	-	-	-	-	-	-	-	-
Bac	-	-	-	-	-	-	-	-
Cas	-	-	-	-	-	-	-	-
Dif	-	-	-	-	-	-	-	-
Wi	-	-	-	-	-	-	-	+

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
Fl	-	-	-	+	-	-	-	+
Bac	-	-	-	-	-	-	-	-
Cas	-	-	-	-	-	-	-	-
Dif	-	-	-	+	-	-	-	+
Wi	-	-	-	+	-	-	-	+

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
Fl	-	-	-	+	-	-	-	+
Bac	-	-	-	-	-	-	-	-
Cas	-	-	-	-	-	-	-	-
Dif	-	-	-	+	-	-	-	+
Wi	-	+	-	+	-	-	+	+

48 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
Fl	-	-	-	+	±	-	-	+
Bac	-	-	-	-	-	-	-	-
Cas	-	-	-	-	-	-	-	-
Dif	-	±	-	+	-	±	-	+
Wi	±	±	±	+	±	±	±	+

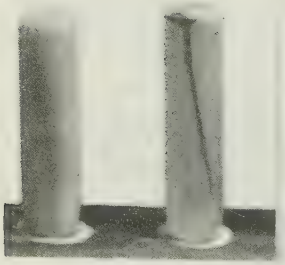

Abb. 7 Bodensatz-einfluß

l. mit, r. ohne Bodensatz

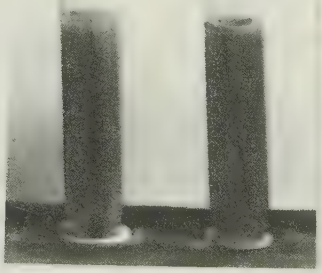

Abb. 8 $CaCl_2$ u. $MgCl_2$

l. mit, r. ohne Salze

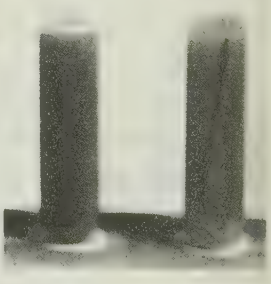

Abb. 9 Bodensatz-einfluß

l. mit, r. ohne Bodensatz

Peptongehalt 1 % Fleisch normaler Agar

Witte-Pepton

C. Freundii 24 Std.

C. Freundii 24 Std.

C. Freundii 24 Std.

In den Versuchen wurde allerdings Calzium und Magnesium in einer Konzentration von 0,1% gemeinsam zugesetzt. Zur Festlegung der optimal wirkenden Konzentration bei beiden Salzen wurde im folgenden Versuch zunächst $CaCl_2$ allein zugesetzt und zwar in den Konzentrationen

0,01 % 0,02 % 0,04 % 0,06 % 0,08 % 0,1 % 0,15 % 0,2 %

Reaktionseintritt: Bei allen Konzentrationen etwa gleich nach 20 - 24 Stunden.

6 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,01 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,02 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,04 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,06 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,08 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,15 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,2 %	-	-	-	-	-	-	-	-

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,01 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,02 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,04 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,06 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,08 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,15 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,2 %	-	-	-	-	-	-	-	-

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,01 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,02 %	-	±	-	+	-	-	-	+
0,04 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,06 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,08 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,1 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,15 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,2 %	-	-	-	+	-	-	-	-

48 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,01 %	±	-	-	+	-	-	-	+
0,02 %	-	±	-	+	-	±	-	+
0,04 %	-	-	-	+	-	-	±	+
0,06 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,08 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,1 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,15 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,2 %	-	-	-	+	-	-	-	+

Zusatz von $MgCl_2$ in den gleichen Konzentrationen zum normalen Bleiazetatagar

6 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,01 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,02 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,04 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,06 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,08 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,15 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,2 %	-	-	-	-	-	-	-	-

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,01 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,02 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,04 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,06 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,08 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,1 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,15 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,2 %	-	-	-	+	-	-	-	+

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,01 %	-	±	-	+	-	-	-	+
0,02 %	-	-	-	+	-	-	±	+
0,04 %	-	-	±	+	-	-	-	+
0,06 %	-	-	-	+	-	±	-	+
0,08 %	±	-	-	+	-	-	-	+
0,1 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,15 %	-	±	-	+	-	±	-	+
0,2 %	-	-	-	+	-	-	-	+

48 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,01 %	-	±	-	+	-	-	-	+
0,02 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,04 %	±	-	±	+	-	±	-	+
0,06 %	-	-	-	+	±	±	-	+
0,08 %	±	-	-	+	-	-	±	+
0,1 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,15 %	-	±	-	+	-	±	-	+
0,2 %	-	-	-	+	±	-	-	+

Die H_2S-Bildung wird lediglich durch Zugabe von Calzium gehemmt, während Magnesium keine Rolle spielt. Die uncharakteristischen Ausfälle bei E. coli können bei Ca-Zusatz weitgehend vermieden werden. Allerdings sind die Reaktionen bei den positiven Stämmen stark vermindert, zumal auch durch das

Auftreten eines Niederschlages bei Zugabe von $CaCl_2$ zum Agar eine unkontrollierbare chemische Reaktion nicht ausgeschlossen ist. Dieser Niederschlag nimmt mit steigendem pH-Wert zum Alkalischen hin und mit steigender $CaCl_2$-Konzentration zu. Es konnte jedoch keine Beziehung in der Hemmung der H_2S-Bildung und den einzelnen Konzentrationen des Calziumsalzes festgestellt werden. Offensichtlich reicht die kleinste Konzentration schon aus, um die H_2S-Bildung zu hemmen.

Zugabe von 1 - 2 Tropfen einer 1 %igen $CaCl_2$-Lösung zum routinemäßigen Bleiazetatagar nach der Beimpfung

Um einerseits die oben erwähnte Reaktion zu vermeiden und andererseits die Schwärzung der positiven Keime zu erhalten, wurde versucht, 1 - 2 Tropfen einer 1 %igen $CaCl_2$-Lösung nach der Beimpfung auf den üblichen Bleiazetatagar aufzutropfen. In dem Falle, daß Calzium eine hemmende Wirkung ausübt, wären mit dieser Methode in dem Bereich, in den der Tropfen hineindiffundiert, die Schwärzungen nicht vorhanden.

Wie aus Abb. 10 ersichtlich, trifft dies bei $CaCl_2$ voll und ganz zu. Im Bereich von etwa 1 - 1,5 cm von der Oberfläche an tritt auch bei den positiven Keimen keine Schwärzung auf, während im Bereich des restlichen Stiches die Reaktion uneingeschränkt vorhanden ist. Da andererseits die uncharakteristischen Ausfälle bei den Escherichia coli-Stämmen bei Verwendung des routinemäßigen Bleiazetatagars (nur bei erhöhter Peptonkonzentration und anderen Peptonarten tritt dieser

Ausfall im gesamten Röhrchen auf) in diesem Bereich der oberen 1 - 1,5 cm erscheinen, wäre hier eine Möglichkeit gegeben, deutlich zwischen H_2S-positiven und H_2S-negativen Keimen zu unterscheiden. Auch wäre diese Methode im Routinebetrieb leicht und ohne viel Aufwand zu verwirklichen.

Zur Sicherung, daß es sich um eine Wirkung des Calziums handelt, wurden andere Salze, wie NaCl und $MgCl_2$ verwendet, bei denen jedoch kein positives Resultat zustandekam. Dagegen zeigte Ca-azetat die gleiche Wirkung wie $CaCl_2$.

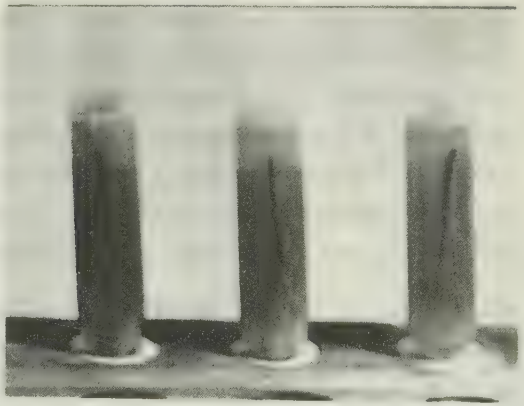

Abb. 10 Zugabe von 1 - 2 Tropfen $CaCl_2$-Lösung nach der Beimpfung

C. Freundii 24 Std.

9. Alter und Ernährungszustand der Keime :

Es wäre denkbar, daß die H_2S-Bildung abhängig vom Alter und dem Ernährungszustand der Keime ist. Zu diesem Zweck wurden die Stämme einen, zwei und drei Tage auf Schrägagar belassen und dann auf Bleiazetatagar übergeimpft. Es wurden jedoch keine Unterschiede festgestellt, sodaß der Ernährungszustand der Keime bzw. deren Alter keinen Einfluß auf die H_2S-Bildung hat.

10. Keimmenge bzw. Beimpfungsdichte :

Folgende Variationen in der Beimpfung wurden angewandt :

a.) Wälzen der Nadel im Keimrasen

b.) Nur Nadelspitze mit Keimen beladen

c.) Nadel in dichte Keimsuspension eingetaucht

d.) Nadel in verdünnte Keimsuspension eingetaucht

Der Reaktionseintritt ist bei c.) und d.) verzögert.

6 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
a	-	-	-	+	-	-	-	+
b	-	-	-	+	-	-	-	+
c	-	-	-	-	-	-	-	-
d	-	-	-	-	-	-	-	-

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
a	-	-	-	+	-	-	-	+
b	-	-	-	+	-	-	-	+
c	-	-	-	-	-	-	-	-
d	-	-	-	-	-	-	-	-

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
a	-	-	-	+	-	-	-	+
b	-	-	-	+	±	-	-	+
c	-	±	-	+	-	-	-	+
d	-	-	-	+	-	-	-	+

48 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
a	-	±	±	+	-	±	±	+
b	±	-	-	+	±	-	-	+
c	-	±	-	+	-	-	-	+
d	-	-	-	+	-	±	-	+

Ergebnis:

Obwohl bei den positiven Keimen der Reaktionseintritt verzögert ist, sind in der Intensität der Schwärzung keine Unterschiede festzustellen. Auch uncharakteristische Ausfälle bei E. coli sind in gleichem Masse vorhanden.

Auch bei einem ähnlichen Versuch, bei dem in ein und dasselbe Röhrchen mit drei verschiedenen Beimpfungsdichten gestochen wurde, zeigte sich, daß die Keimmenge keinen Einfluß auf die H_2S-Bildung hat.

11. Einfluß der Luft :

Zu diesem Zweck wurden die Bleiazetatagarröhrchen nach der Beimpfung mit sterilem, flüssigem Paraffin überschichtet.
Es zeigte sich zunächst bei einer Untersuchung mit den acht Teststämmen, daß die positiven Reaktionen nicht beeinflußt werden. Bei den sechs E. coli-Stämmen waren eindeutig negative Ergebnisse zu sehen. Ein darauf folgender, erweiterter Versuch ergab, daß bei allen untersuchten E. coli-Stämmen der Bleiazetatagar nach Überschichtung mit Paraffin keine uncharakteristischen Ausfälle zeigte.

Während ein Luftabschluß auf der Basis des Anaerobentopfes wegen der nach dem Abfüllen im Agarröhrchen befindlichen Luft, die beim Evakuieren oftmals ein Herausziehen des Agars aus dem Röhrchen bewirkt, technisch aus diesen Gründen nur sehr schwer zu verwirklichen ist, wurde folgender Modellversuch als besser befunden :

Nach dem Beimpfen der Röhrchen wurde zunächst in einer Höhe von etwa einem Zentimeter über der Agaroberfläche ein steriler Wattepfropf angebracht, auf den eine Messerspitze Pyrogallol aufgestreut wurde. Nach Zugabe von 2 - 3 Tropfen n-NaOH wurden die Röhrchen luftdicht verschlossen, wodurch in den Röhrchen eine sauerstoffarme Atmosphäre entstand.

Bei einer Untersuchung mit dieser Methode zeigten 30 Stämme H_2S-positiver Salmonellen keine Beeinflussung der Schwärzung. Dagegen sah man bei der gleichen Anzahl E. coli nicht in einem Fall einen uncharakteristischen Ausfall, obwohl dieselben Stämme im Parallelversuch ohne Luftabschluß in einigen Fällen derartige Ausfälle zeigten.
In einem H_2S-haltigen Luftmilieu - erzeugt im Anaerobentopf durch gleichzeitiges Bebrüten von einigen Stämmen Clostridium putrificus in offenen Leber-Leber-Bouillon-Röhrchen - war der Prozentsatz der uncharakteristischen Ausfälle bei E. coli weit höher als bei normaler Luft.
Daraus muß geschlossen werden, daß sowohl der Sauerstoffgehalt als auch der H_2S-Gehalt der Luft und somit der Luftzutritt an sich eine wesentliche Rolle spielt. Ihm kommt bei der Bildung der uncharakteristischen Ausfälle bei H_2S-negativen Keimen wohl die größte Bedeutung zu.

Zum Abschluß der Versuche mit Bleiazetatagar sei noch erwähnt, daß es auffliel, daß eine ältere Charge Bleiazetat als Indikator deutlichere Schwärzung als eine neue ergab. Da Bleihydroxyd auch stärker als Bleiazetat wirkt, ist bei der älteren Charge durch den Luftsauerstoff ein Teil des Bleiazetats in Bleihydroxyd umgewandelt worden, wodurch sich diese Erscheinung erklärt.

II. EISENGELATINE NACH KAUFFMANN

Dieser Nährboden ermöglicht es, die H_2S-Bildung durch Einhängen von Indikatorpapieren zu verfolgen.

a.) Bleiazetatpapier:

Fabrikmäßig hergestelltes Bleiazetatpapier (Merck) angefeuchtet in das Röhrchen eingehängt

b.) Wismutpapier:

Steriles, in Streifen geschnittenes Filterpapier wird unmittelbar vor dem Einhängen mit einer 1%igen Wismutammoniumcitratlösung getränkt.

1. Variation des Gelatinegehaltes:

Konzentrationen

4 % 6 % 8 % 10 % 12 % 14 % 16 %

Reaktionseintritt: Bei allen positiven nach 9 Stunden

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
4 %	-	-	-	+	-	-	-	+
6 %	-	-	-	+	-	-	-	+
8 %	-	-	-	+	-	-	-	+
10 %	-	-	-	+	-	-	-	+
12 %	-	-	-	+	-	-	-	+
14 %	-	-	-	+	-	-	-	+
16 %	-	-	-	+	-	-	-	+

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
4 %	-	-	-	+	-	-	-	+
6 %	-	-	-	+	-	-	-	+
8 %	-	-	-	+	-	-	-	+
10 %	-	-	-	+	-	-	-	+
12 %	-	-	-	+	-	-	-	+
14 %	-	-	-	+	-	-	-	+
16 %	-	-	-	+	-	-	-	+

Ergebnis:

Bei den positiven Keimen zeigten die Röhrchen aller Konzentrationen eine etwa gleich starke Schwärzung. Bei den sechs E. coli-Stämmen waren eindeutig negative Reaktionen zu sehen. Auch eine Wiederholung des Versuches mit den Konzentrationen 1 % 2 % 3 % 4 % und 10 % brachte die gleichen Ergebnisse.

Der Gelatinegehalt spielt demnach keine Rolle bei der H_2S-Bildung.

Bleiazetatpapier und Wismutpapier zeigten erst nach 48 Stunden eine schwache Bräunung, die sich in den darauffolgenden Tagen etwas verstärkte. Das Wismutpapier erschien empfindlicher.

2. Variation des pH-Wertes:

Routinemäßige Eisengelatine mit n-NaOH bzw. n-HCL eingestellt auf pH 6,5 pH 7 pH 7,5 pH 8 pH 8,5

Reaktionseintritt: bei pH 6,5 erst nach 30 - 35 Stunden
bei allen anderen nach etwa 9 Stunden

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
6,5	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	+	-	-	-	+
7,5	-	-	-	+	-	-	-	+
8	-	-	-	+	-	-	-	+
8,5	-	-	-	+	-	-	-	+

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
6,5	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	+	-	-	-	+
7,5	-	-	-	+	-	-	-	+
8	-	-	-	+	-	-	-	+
8,5	-	-	-	+	-	-	-	+

Ergebnis: siehe auch Abb. 11

Als pH-Optimum ergibt sich pH 7 - 8. Bei einem pH-Wert über 8 wird die Schwärzung geringer, bei einem pH-Wert unter 7 nur sehr spät und schwach positiv. Der pH-Wert bei der Eisengelatine muß daher sehr sorgfältig eingestellt werden.

Bleiazetat- und Wismutpapier zeigen nach 48 Stunden eine leichte Bräunung. Als Besonderheit wurde bei einem Röhrchen bemerkt, daß bei einem pH-Wert von 6,5 sich zuerst die beiden Papiere anfärbten und später erst die Eisengelatine. In dem leicht sauren Medium vermag sich der entstehende Schwefelwasserstoff nicht mehr mit den vorhandenen Pb-ionen zu verbinden, sondern diffundiert in gasförmiger Phase in den Luftraum oberhalb der Agarsäule, wo er die eingehängten Indikatorpapiere schwärzt.

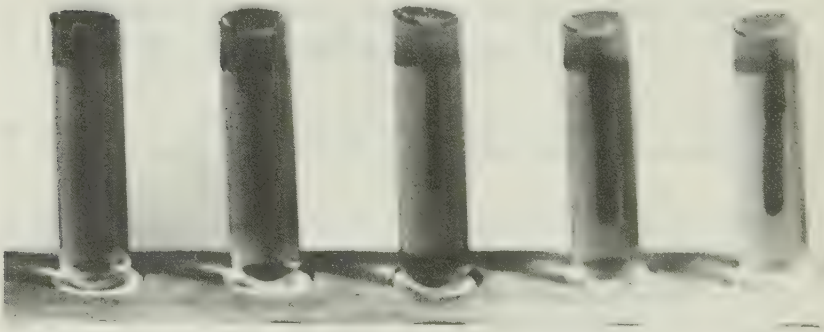

Abb. 11 Variation des pH-Wertes normale Eisengelatine
v.l. pH 6,5 7 7,5 8 8,5
Citrobacter Freundii 48 Stunden

3. Variation des Peptongehaltes: (Pepton aus Fleisch)

Konzentrationen:

0,5 % 1 % 1,5 % 2 % 2,5 % 3 % 3,5 %

Reaktionseintritt: Bei allen positiven nach 9 Stunden Später dann Abstufung in der Intensität

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,5 %	-	-	-	+	-	-	-	+
1 %	-	-	-	+	-	-	-	+
1,5 %	-	-	-	+	-	-	-	+
2 %	-	-	-	+	-	-	-	+
2,5 %	-	-	-	+	-	-	-	+
3 %	-	-	-	+	-	-	-	+
3,5 %	-	-	-	+	-	-	-	+

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,5 %	-	-	-	+	-	-	-	+
1 %	-	-	-	+	-	-	-	+
1,5 %	-	-	-	+	-	-	-	+
2 %	-	-	-	+	-	-	-	+
2,5 %	-	-	-	+	-	-	-	+
3 %	-	-	-	+	-	-	-	+
3,5 %	-	-	-	+	-	-	-	+

Ergebnis: siehe auch Abb 12

Bei den positiven Stämmen nimmt die Intensität der Schwärzung mit steigendem Peptongehalt zu. Die Escherichia coli-Stämme zeigten bei keiner Konzentration einen zweifelhaften Ausfall. Sie waren alle eindeutig negativ.

Bleiazetat- und Wismutpapier färben sich nach 48 Stunden braun. Sie sind jedoch beide zu unempfindlich, um die Intensitätsunterschiede bei den steigenden Konzentrationen anzuzeigen.

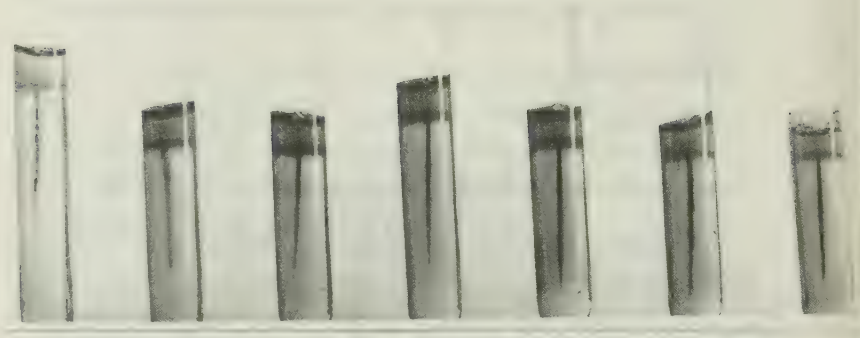

Abb. 12 Variation des Peptongehaltes aus Fleisch (Merck)
v.l. 0,5 % 1 % 1,5 % 2 % 2,5 % 3 % 3,5 %
Citrobacter Freundii 24 Stunden

Wiederholung des Versuches mit den Konzentrationen

1 % 2,5 % 4 % 7 % 10 %

Reaktionseintritt: nach 7 - 8 Stunden 10 % und 7 %
nach 9 Stunden 4 % und 2,5 %
nach 10 Stunden 1 %

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
1 %	-	-	-	+	-	-	-	+
2,5 %	-	-	-	+	-	-	-	+
4 %	-	-	-	+	-	-	-	+
7 %	-	-	-	+	-	-	-	+
10 %	-	-	-	+	-	-	-	+

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
1 %	-	-	-	+	-	-	-	+
2,5 %	-	-	-	+	-	-	-	+
4 %	-	-	-	+	-	-	-	+
7 %	-	-	-	+	-	-	-	+
10 %	-	-	-	+	-	-	-	+

Ergebnis: siehe auch Abb. 13

Die Resultate stimmen mit den vorigen überein.

Alle E.coli-Stämme reagierten negativ.

Die Papiere zeigten keine Intensitätsunterschiede an.

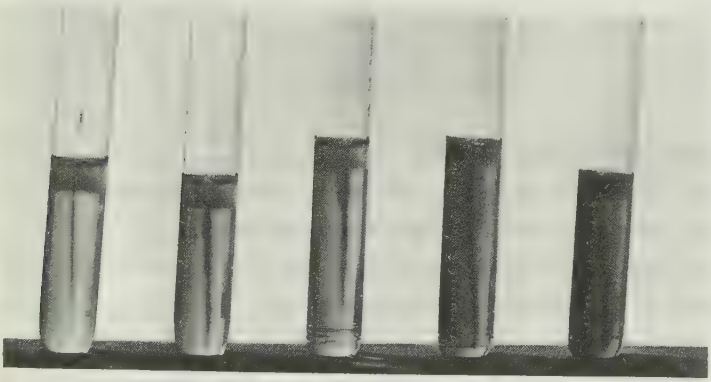

Abb. 13 Variation des Peptongehaltes aus Fleisch (Merck)
v.l. 1 % 2,5 % 4 % 7 % 10 %
Citrobacter Freundii 24 Stunden

4. Variation der Peptonart:

Verwendung von Pepton aus Fleisch, Bacto-Pepton, Casein-Pepton, Proteose-Pepton (Difco) und Witte-Pepton.

Reaktionseintritt: nach 6 Stunden Proteose-P.
nach 8 Stunden Witte-P.
nach 10 Stunden Fleisch- und Bacto-P.
nach 12 Stunden Casein-P.

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
43	-	-	-	-	-	-	-	-
Fl	-	-	-	+	-	-	-	+
Bac	-	-	-	+	-	-	-	+
Cas	-	-	-	+	-	-	-	+
Dif	-	-	-	+	-	-	-	+
Wi	-	-	-	+	-	-	-	+

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
43	-	-	-	+	-	-	-	+
Fl	-	-	-	+	-	-	-	+
Bac	-	-	-	+	-	-	-	+
Cas	-	-	-	+	-	-	-	+
Dif	-	-	-	+	-	-	-	+
Wi	-	-	-	+	-	-	-	+

Ergebnis: siehe auch Abb 14

Bei den positiven Keimen läßt sich folgende Abstufung in der Intensität der einzelnen Arten angeben:

Proteose-P. Witte-P. Fleisch-P. Bacto-P. Casein-P.

Alle E. coli-Stämme reagierten negativ.

Die Papiere färbten sich bei Proteose-P. nach 24 Stunden, bei Witte-P. nach 30 - 35 Stunden, bei den anderen nach etwa 48 Stunden.

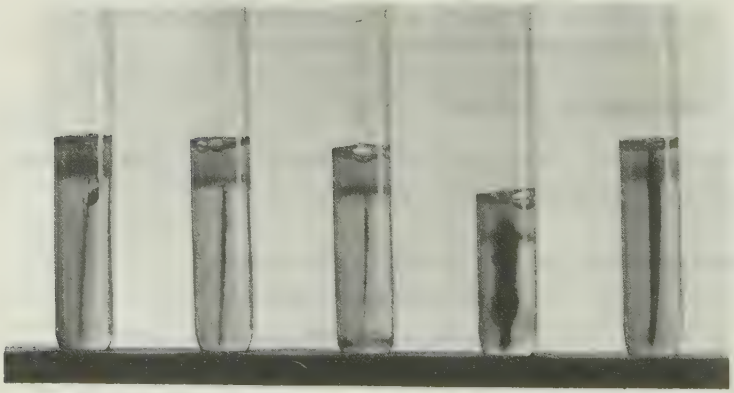

Abb. 14 Variation der Peptonart

v.l. Fleisch-P. Bacto-P. Casein-P. Proteose-P. Witte-P.

Citrobacter Freundii 24 Stunden

5. Dextrosezusatz :

Verdünnung einer Eisengelatine, die 0,1 % Dextrose enthält, mit normaler Eisengelatine auf die Konzentrationen

0,003 % 0,006 % 0,012 % 0,025 % 0,05 % 0,1 %

Reaktionseintritt: nach 12 Stunden 0,003 % 0,006 % 0,012 %
nach 15 Stunden 0,025 % 0,05 %
nach 24 Stunden schwach 0,1 %

12 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,003%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,006%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,012%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,025%	-	-	-	-	-	-	-	-
0,05 %	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-

24 St.	1	2	3	4	5	6	7	8
0,003%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,006%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,012%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,025%	-	-	-	+	-	-	-	+
0,05 %	-	-	-	+	-	-	-	+
0,1 %	-	-	-	+	-	-	-	+

Ergebnis:

Dextrosezusatz verzögert bei den positiven Stämmen den Reaktionseintritt, während die Intensität der Schwärzung nach 24 Stunden ziemlich gleich ist. Lediglich bei 0,1 % bleibt die Schwärzung, auch nach mehreren Tagen, sehr schwach. Der Ausfall der Reaktion ist gegenüber Chargen ohne Glucose vermindert. Glucose hemmt die H_2S-Bildung, da die Keime zuerst den Zucker und dann das Eiweiß spalten. Die E.coli-Stämme waren negativ.

Die Papiere färbten sich nach 48 Stunden braun, bei 0,1 % Dextrosezusatz ist die Färbung nur sehr schwach.

6. Zusatz des Esters der Brenztraubensäure und der Natronlauge:

Zusatz von Brenztraubensäureester der Natronlauge (Natriumpyruvat) in den Konzentrationen 1 %, o,75 % und 0,5 % hemmt die H_2S-Bildung sehr stark. Erst nach 4-5 Tagen tritt bei den positiven Keimen eine schwache Schwärzung auf. Die Papiere bleiben farblos. Allerdings ist eine chemische Reaktion bei Zugabe des Esters zur Eisengelatine aufgrund des $FeCl_2$ nicht auszuschließen.

Methylenblauzusatz:

Zusatz von 2,5 ccm ad 100 ccm Eisengelatine einer Methylenblaulösung (1 ccm gesätt. alkohol. Lösung von methylenblau medicinale ad 39 ccm aqua dest.) hat bei den positiven Keimen weder auf den Reaktionseintritt noch auf die Intensität der Schwärzung einen Einfluß.

8. Kaliumnitratzusatz:

Zusatz von 3 Tropfen einer 10 %igen Kaliumnitratlösung zu einem Röhrchen hemmt die H_2S-Bildung enorm. Auch nach 5 und mehr Tagen trat bei den positiven Keimen keine Schwärzung auf; eine chemische Reaktion des Kaliumnitrat mit $FeCl_2$ ist auch hier möglich.

9. Einfluß der Luft:

Die Überschichtung mit Paraff. liquid. und der dadurch erzielte Luftabschluß haben keinen Einfluß auf die Reaktion. Die positiven Keime zeigten die gleichen Resultate wie ohne Luftabschluß. Die E. coli-Stämme sind sowieso negativ. Die Papiere bleiben farblos, da das Paraffin das gebildete H_2S abhält.

Allerdings zeigte sich bei der Eisengelatine eine Eigentümlichkeit, die auf allen Eisengelatineabbildungen und vor allem auf den Abb. 15 und 16 zu erkennen ist:
Nach dem Abfüllen und dem Erstarren der Eisengelatine im Röhrchen ist im oberen Bereich der erstarrten Gelatine ein Ring zu sehen, der trüb erscheint. Dieser Ring wird umso breiter, je mehr Zeit die Gelatine zum Erstarren benötigt, d.h. je länger die Luft auf die flüssige Gelatine einwirken kann. Stellt man die Röhrchen sofort in den Eisschrank, bzw. ins Eiswasser, so erscheint kein Ring, läßt man Kontrollröhrchen zunächst 24 Stunden im 37-Grad-Schrank und dann erstarren, so erscheint das ganze Röhrchen trüb. (siehe Abb. 15). Auch nach dem Erstarren geht unter dem Lufteinfluß die Bildung des Ringes weiter, jedoch nur ganz gering. Im Bereich des Ringes tritt bei den positiven Keimen keine Schwärzung auf (Abb. 16).

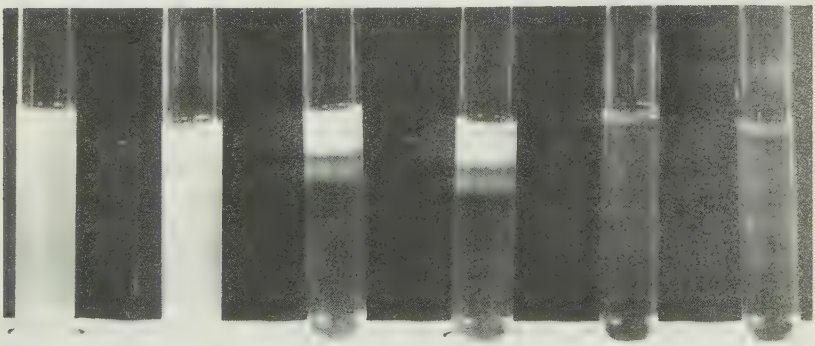

Abb 15 Normale Eisengelatine unbeimpft
v.l. 2 Röhrchen vor Erstarren 24 Std. im Brutschrank
2 Röhrchen an der Luft erstarren lassen
2 Röhrchen sofort in Eisschrank

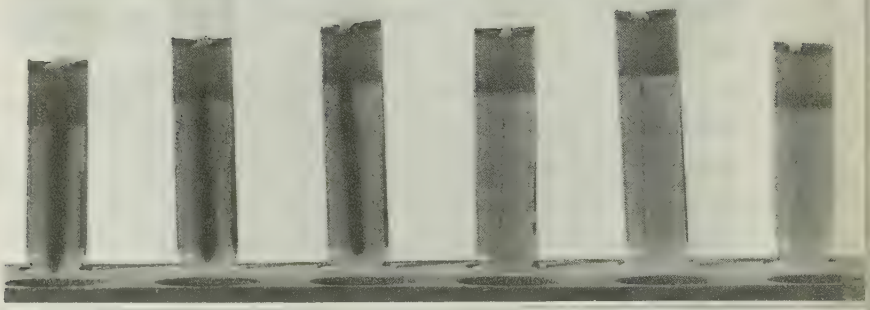

Abb. 16 Normale Eisengelatine beimpft nach 24 Stunden
l. drei Stämme Salmonellen, r. drei Stämme E. coli
Im Bereich des Ringes keine Schwärzung bei Salmonellen

Auch die Temperatur der Eisengelatine beim Abfüllen spielt natürlich eine Rolle, da bei höherer Temperatur die Gelatine längere Zeit zum Erstarren benötigt und die Luft länger einwirken kann.

Da die Lufteinwirkung offenbar eine große Rolle spielt, ist die Bildung des Ringes eigentlich nur so zu erklären, daß sich im oberen Bereich das Eisen-II-Salz in Eisen-III-Salz umwandelt:

$$2\ Fe^{++} \longrightarrow Fe^{+++} + 1\ e$$

Dadurch wäre auch zu erklären, daß die Schwärzung im Ring ausbleibt, da das Eisen-III-Salz nicht mit H_2S reagiert.

Diese Tatsache wurde in folgendem chemischen Versuch belegt:

Herstellung von H_2S durch Auftropfen von konz. HCl auf FeS und einleiten in einen Exsiccator, der vorher evakuiert wurde

und in dem eine $FeCl_2$- und eine $FeCl_3$-Lösung vorhanden ist.
Ergebnis:
Schwärzung der $FeCl_2$-Lösung durch einen Niederschlag:

$$FeCl_2 + H_2S \longrightarrow FeS + 2H^+ + 2\,Cl^-$$

Diese Reaktion entspricht der Schwärzung der Eisengelatine. Die $FeCl_3$-Lösung dagegen bleibt farblos. Es entsteht jedoch ein kolloidaler Ausfall, der sich bei mikroskopischer Untersuchung als monokliner Schwefel erweist.

$$2\,Fe^{+++} + 3\,S^{--} \longrightarrow Fe_2S_3 \longrightarrow 2\,FeS + S$$

Da sich bei den beimpften Röhrchen im Bereich des Ringes aufgrund dieser Reaktion ebenfalls ein mit Hilfe des Tyndalleffektes zu erkennender kolloidaler Niederschlag zeigt, liegt der Vergleich auf der Hand.

So findet sich das Kuriosum, daß die Luft bei Bleiazetatagar und bei Eisengelatine gerade entgegengesetzten Einfluß ausübt.

Parallel zu obigem chemischem Versuch wurden auch zwei Chargen Bleiazetatlösung mit Schwefelwasserstoff versetzt. Die eine Charge wurde zunächst längere Zeit an der Luft geschüttelt, während die andere sofort in den Exsiccator gestellt wurde. In beiden Fällen entstand ein massiver schwarzer Niederschlag von PbS.

D i s k u s s i o n

Bei den Untersuchungen über die Schwefelwasserstoffbildung wurde erkannt, daß grundsätzlich Escherichia coli, Citrobaxter intermedius und Aerobacter keine H_2S-Bildung auf den routinemäßigen Nährböden Bleiazetatagar und Eisengelatine zeigen, während Citrobacter Freundii und nahezu alle Salmonellenarten H_2S-positiv sind. Diese Ergebnisse sind mit der Eisengelatine einwandfrei nachzuweisen. Beim Bleiazetatagar wurde jedoch sehr häufig ein Versagen des Nährbodens festgestellt, und zwar hauptsächlich in der Art, daß bei den H_2S-negativen Stämmen schwache Ausfälle zu sehen waren, die eine Differenzierungsmöglichkeit illusorisch machen. Diese Ausfälle treten willkürlich auf und hängen nie vom Keim selbst, sondern von der Zusammensetzung des Nährbodens bzw. von den inkonstanten äußeren Bedingungen ab.

Bei den Versuchen mit den Variationen der Zusammensetzung der Nährböden und den Bedingungen, unter denen die H_2S-Bildung zustandekommt, wurde gefunden:

1. Bleiazetatagar:

Der Agar-Agar-Gehalt in den Konzentrationen von 0 % bis 4 % spielt keine Rolle bei der H_2S-Bildung. Die Steigerung des Peptongehaltes dagegen läßt die Intensität der Schwärzung bei den positiven Keimen und den Prozentsatz der uncharakteristischen Ausfälle ansteigen. Dies erklärt sich aus dem

sich steigernden Angebot an schwefelhaltigen Aminosäuren, die im Pepton enthalten sind. In der gleichen Art liefern Proteose- und Witte-Pepton intensivere Schwärzungen bei den positiven Stämmen und eine größere Ausbeute an uncharakteristischen Ausfällen, während Casein- und Bacto-Pepton nur sehr schwache Ergebnisse liefern. Pepton aus Fleisch liegt etwa in der Mitte und ist am besten geeignet. Der pH-Wert muß über pH 7 liegen, da im sauren Bereich die H_2S-Bildung vermindert ist. Die Beimpfungsdichte sowie das Alter bzw. der Ernährungszustand der Keime haben keinen Einfluß. Glucose und der Brenztraubensäureester der Natronlauge (Natriumpyruvat) hemmen die H_2S-Bildung so stark, daß zwar keine schwach positiven Ausfälle bei negativen Stämmen zu sehen waren, andererseits aber auch die Ausfälle bei den positiven Keimen zu schwach waren. Der Luftzutritt hat keinen Einfluß auf die positiven Stämme. Er darf jedoch für die uncharakteristischen Ausfälle mitverantwortlich gemacht werden, da bei Luftabschluß diese Reaktionen nicht vorhanden sind.

2. Eisengelatine:

Bei der Eisengelatine wurde in keinem einzigen Fall eine schwach positive Reaktion bei einem negativen Stamm beobachtet. Die Variationen der Zusammensetzung des Nährbodens können somit nur einen Einfluß auf die positiven Reaktionen haben. Der Gelatinegehalt hat keinen Einfluß. Ebenso wie beim Bleiazetatagar wird mit steigendem Peptongehalt die Intensität der Schwärzung bei den positiven Keimen stärker.

Die Reaktionen der H_2S-negativen Stämme bleiben jedoch bei der Eisengelatine eindeutig negativ. Ebenso verhält es sich bei der Variation der Peptonart, wobei Proteose- und Witte-Pepton stärkere und Casein- und Bacto-Pepton schwächere Reaktionen als das Pepton aus Fleisch ergeben. Auch hierbei wurden keine schwach positiven Ausfälle bei negativen Keimen gefunden. Auch hier soll der pH-Wert über pH 7 liegen, da sonst die H_2S-Bildung nur sehr schwach zu sehen ist. Zusatz von Glucose hemmt die positiven Ausfälle. Die Luft hat keinen Einfluß, da die positiven Reaktionen bei Luftzutritt ungestört vorhanden sind und die Reaktionen bei den negativen Stämmen eindeutig negativ bleiben.

Weitere Untersuchungen mit Bleiazetatagar :

Da sich die Eisengelatine als äußerst zuverlässig erwies, wurden die Verhältnisse nur beim Bleiazetatagar näher untersucht. Beim Abwägen der Ergebnisse mit diesem Nährboden ergibt sich ein Gleichgewicht zwischen Stärke der positiven Reaktionen und den uncharakteristischen Ausfällen , d.h. es läßt sich eine optimale Zusammensetzung finden, bei der alle positiven Ausfälle vorhanden sind und der Prozentsatz der uncharakteristischen Ausfälle möglichst niedrig ist. Diese Zusammensetzung entspricht dem routinemäßigen Bleiazetatagar und ist deshalb zur genauen Differenzierung ungeeignet, da viele negative Stämme schwach positive Reaktionen zeigen. Verringert man die Komponenten im Nährboden, die eine H_2S-Bildung fördern bzw. erhöht die Konzentration der Komponenten,

die die H_2S-Bildung hemmen oder setzt H_2S-hemmende Stoffe zu, so erreicht man zwar eine Reduzierung der unspezifisch positiven Ausfälle bei den negativen Keimen, doch es besteht die Gefahr, daß man bei den positiven Stämmen schwache H_2S-Bildner nicht mehr erfaßt.

So erscheint es zweckmäßiger, die Ursachen dieser Ausfälle zu erkennen und nach Möglichkeit auszuschalten. Als Ursachen kommen nach den Untersuchungen mit dem Bleiazetatagar in Frage:

1. Einfluß der Luft:

   Die Luft darf nach den gewonnenen Ergebnissen in erster Linie für die uncharakteristischen Ausfälle verantwortlich gemacht werden. Durch den Luftsauerstoff wird ein Teil des Bleiazetats im oberen Bereich des Röhrchens, wo die Ausfälle auftreten, in Bleihydroxyd umgewandelt, das mit H_2S stärker reagiert. Analog dazu zeigt eine ältere Charge Bleiazetat intensivere Schwärzungen als eine neue Charge. Ferner wurde gefunden, daß der H_2S-Gehalt der Luft eine große Rolle spielt.

Daraus ergibt sich, daß der Bleiazetatagar nur bei Luftabschluß zur Differenzierung von H_2S-positiven und negativen Keimen geeignet ist.

Die Eisengelatine zeigt diese Erscheinungen nicht, da $FeCl_2$ durch die Luft in $FeCl_3$ umgewandelt wird, das mit H_2S nicht reagiert und $FeCl_2$ außerdem gegen H_2S unempfindlicher als Bleiazetat ist.

2. Einfluß des Bodensatzes :

Eine nicht zu übersehende Bedeutung kommt bei der Herstellung des Fleischwasseragars dem Dekantieren zu. Der Bodensatz mit seiner wirksamen Komponente, dem Calzium, hemmt die H_2S-Bildung. Wird der Bodensatz und damit das Calzium entfernt, so treten in steigendem Maße uncharakteristische Ausfälle auf. Dies hat vor allem dann Ungenauigkeiten zur Folge, wenn Herstellungschargen von weniger als einem Liter verwendet werden, da bei diesen mehr Bodensatz ausfällt und verlorengeht.

3. Unachtsamkeiten bei der Herstellung :

Neben dem Bodensatz sind bei der Herstellung des Agars noch weiter zu beachten :
Der Gehalt an Pepton aus Fleisch muß genau 1 % betragen. Der pH-Wert soll bei 7,2 bis 7,6 liegen. Das Fleischwasser soll stets konstant 4:1 zu Gunsten des Fleischwassers verdünnt werden. Dies ist besonders wichtig, da festgestellt wurde, daß bei größerer Verdünnung das Wachstum und damit die H_2S-Bildung abnimmt, sodaß schwache H_2S-Bildner unter Umständen nicht mehr erfaßt werden. Andererseits sind bei konzentrierterer Verwendung des Fleischwassers mehr uncharakteristische Ausfälle bei E. coli zu sehen.

Überblickt man die gesamten Resultate, so muß gesagt werden, daß der routinemäßige Bleiazetatagar ungeeignet ist.
Schaltet man jedoch die Ursachen aus, so ist er zu verwenden. Bleiazetat- und das empfindlichere Wismutpapier lassen nur einen sehr inkonstanten qualitativen Nachweis zu, der an den Nachweis mittels der Nährböden nicht heranreicht.

Aufgrund der Untersuchungen ergeben sich folgende Verbesserungsvorschläge :

1. Eisengelatine nach KAUFFMANN :

Dieser Nährboden wird in jeder Beziehung den Anforderungen gerecht, die an einen H_2S-Nährboden gestellt werden. Die Schwärzung ist deutlich zu sehen, viel besser als die Bräunung des ohnehin schon bräunlichen Bleiazetatagars. Die Fehlerquellen des Bodensatzes, der Fleischwasserverdünnung und des Luftzutrittes sind ausgeschaltet. Lediglich die genaue Einstellung des pH-Wertes ist zu beachten, da die Gelatine sehr stark puffert und eine genaue Einstellung auf pH 7,4 - 7,6 erschwert. Ferner empfiehlt es sich, die Gelatine nicht zu heiß abzufüllen und gleich abzukühlen, um die Bildung eines $FeCl_3$-Ringes im oberen Bereich des Röhrchens zu vermeiden.

2. Luftabschluß bei Bleiazetatagar :

Wird der routinemäßige Bleiazetatagar derart behandelt, daß die Röhrchen nach der Beimpfung mit sterilem, flüssigem Paraffin überschichtet werden, so ist er zur genauen Differenzierung von H_2S-negativen und H_2S-positiven Keimen geeignet.

3. Calziumtropfenzusatz :

Zur Ausnützung der H_2S-hemmenden Eigenschaft des Calziums wird auf das übliche Bleiazetatagarröhrchen nach der Beimpfung 1-2 Tropfen einer 1 %igen $CaCl_2$-Lösung aufgetropft. Auch eine Calziumazetatlösung kann verwendet werden. Das Calzium hemmt die H_2S-Bildung im oberen Bereich, soweit es

hineindiffundiert. Dieser Bereich ist identisch mit demjenigen, in dem aufgrund des Luftzutrittes eine Schwärzung auftritt. Die uncharakteristischen Ausfälle können so vermieden werden. Bei den positiven Keimen kommt die Schwärzung im größeren unteren Bereich ohne Einschränkungen zustande.

Dextrose-, Natriumbrenztraubensäureester- oder $CaCl_2$-Zusatz zum Agar erwies sich als mangelhaft. Zwar werden die uncharakteristischen Ausfälle verhindert, aber es besteht die Möglichkeit, schwache H_2S-positive Keime nicht zu erfassen.

Mit diesen drei Verbesserungsvorschlägen wurden alle 210 aus der Regnitz isolierten Stämme untersucht. Als Ergänzung dazu auch noch folgende Salmonellenarten:

H_2S-positive Arten:

S. paratyphi B	S. heidelberg	S. enteritidis Gärtner
S. oranienburg	S. panama	S. " Rostock
S. enteritidis	S. thompson	S. " Kiel
S. typhi murium	S. schottmülleri	S. " Jena
S. anatum	S. bovis morbificans	S. typhi
S. abortus bovis	S. braenderup	S. bareilly
S. muenster	S. chester	

H_2S-negative Arten:

S. abortus equi	S. voldagsen	S. paratyphi A.
S. cholerae suis		

Wechselnde Art: S. pullorum

Bei den 210 isolierten Stämmen und den Salmonellen zeigten alle drei Vorschläge einwandfreie Ergebnisse.
Sie sind zur genauen Differenzierung von H_2S-positiven und H_2S-negativen Stämmen zu verwenden.

Zusammenfassung

Mit 210 Stämmen Escherichia coli, Citrobacter intermedius und Freundii und Aerobacter, sowie mit etwa 30 Salmonellenarten wurde die Konstanz der Schwefelwasserstoffbildung dieser Keime auf den Nährböden Bleiazetatagar und Eisengelatine untersucht.

1. Eisengelatine nach KAUFFMANN :
Die Eisengelatine erwies sich zur Differenzierung von H_2S-positiven und negativen Stämmen geeignet. Die Reaktionen der positiven Keime waren deutlich zu sehen und in keinem einzigen Fall ergab ein H_2S-negativer Stamm einen schwach positiven Ausfall. So hatten die Variationen der Zusammensetzung des Nährbodens lediglich einen Einfluß auf die positiven Reaktionen, da selbst bei Zugabe der H_2S-fördernden Komponenten die negativen Keime eindeutig negative Reaktionen ergaben.

Die Gelatinekonzentration im Bereich von 4 % bis 16 % spielt keine Rolle. Das pH-Optimum liegt bei 7,4 bis 7,6. Mit Steigerung der Peptonkonzentration (untersucht von 0,5 % bis 10 %) wird die Intensität der Schwärzung größer. Proteose- und Witte-Pepton sind stärkere, Casein- und Bacto-Pepton sind schwächere H_2S-bildende Peptonarten als das Pepton aus Fleisch. Dextrosezusatz ab 0,025 % hemmt die H_2S-Bildung. Der Luftzutritt spielt keine Rolle, die negativen Stämme zeigen eindeutig negative Reaktionen.

2. Bleiazetatagar :

Der routinemäßige Bleiazetatagar erwies sich zur genauen Differenzierung nicht geeignet, da bei den negativen Keimen immer wieder uncharakteristische Ausfälle beobachtet werden, die eine Differenzierung illusorisch machen.

Der Agar-Agar-Gehält, die Beimpfungsdichte und das Alter bzw. der Ernährungszustand der Keime spielen keine Rolle.

Das pH-Optimum liegt hier bei pH 7,2 bis pH 7,6.

Gegenüber dem routinemäßigen Bleiazetatagar wirken hemmend:

1. Verminderung des Peptongehaltes unter 1 %
2. Verwendung von Casein- und Bacto-Pepton an Stelle von Pepton aus Fleisch
3. Zusatz von Glucose ab einer Konzentration von 0,025 %
4. Zusatz von Natriumpyruvat (Ester der Brenztraubensäure und der Natronlauge) ab 0,5 %.

Gegenüber dem routinemäßigen Bleiazetatagar wirken fördernd:

1. Erhöhung des Peptongehaltes über 1 %
2. Verwendung von Proteose- und Witte-Pepton an Stelle von Pepton aus Fleisch.

Eine Förderung der H_2S-Bildung hat eine intensivere Schwärzung des Nährbodens zur Folge. Gleichzeitig nimmt auch die Zahl der unspezifisch positiven Ausfälle zu. Eine Hemmung der H_2S-Bildung bewirkt zwar eine Reduzierung dieser Ausfälle, bringt jedoch die Gefahr mit sich, daß schwache H_2S-Bildner bei den positiven Keimen nicht erfaßt werden.

Es erscheint zweckmäßiger, beim routinemäßigen Bleiazetatagar den Ursachen dieser uncharakteristischen Ausfälle nachzugehen und sie auszuschalten.

Als Ursachen des Versagens des Bleiazetatagars wurden gefunden:

1. Luftzutritt
2. Inkonstante Verdünnung des Fleischwassers
3. Verarmung des Nährbodens an Calziumsalzen, welche bei der Nährbodenherstellung in wechselnder Menge im Bodensatz verloren gehen.

Auf Grund dessen werden zur genauen Prüfung der H_2S-Bildung empfohlen:

1. Eisengelatine nach KAUFFMANN
2. Bleiazetatagar, der zum Zwecke des Luftabschlusses nach der Beimpfung mit 1 ccm sterilem Paraff. liquid. überschichtet wird.
3. Bleiazetatagar, auf den nach der Beimpfung 1 - 2 Tropfen einer 1 %igen $CaCl_2$-Lösung aufgetropft werden, um eine Schwärzung im oberen Bereich des Röhrchens zu vermeiden.

Mit diesen drei Methoden wurden alle eingangs erwähnten Enterobacteriaceen auf ihre H_2S-Bildung untersucht.

<u>Alle Stämme Escherichia coli, Citrobacter intermedius, Aerobacter cloacae und Aerobacter aerogenes zeigten keine H_2S-Bildung.</u>

<u>Alle Stämme Citrobacter Freundii und die H_2S-positiven Salmonellenarten ergaben positive Ergebnisse.</u>

Ausnahmen bildeten die H_2S-negativen Stämme S. cholerae suis, S. voldagsen, S. paratyphi A und S. abortus equi, die negative Reaktionen zeigten, sowie der unterschiedlich reagierende Stamm S. pullorum.

Die drei Vorschläge erwiesen sich zur Differenzierung von H_2S-positiven und negativen Keimen gut geeignet.

S c h r i f t t u m

1. ANDERSON u. JOHANNSON : J.Gen.Microbiol. 30, 485-95 1963
2. ARTMANN : J.Gen.Microbiol. 14, 315-322 1956
3. BADER u. HOTZ : Zschft.f.Hyg.u.Bakt. 133, 20-25 1951
4. BAUMGÄRTNER u. BAUM : Ernährungsforschung 5, 40-55 1960
5. BRISOU u. MORAND : Ann.Inst.Pasteur 82, 643 1952
6. CLARKE : J.Gen.Microbiol. 8, 397-407 1953
7. GUNSALUS : J.Biol.Chem. 181, 171-182 1949
8. HALLMANN : Bakteriologische Nährböden, 117
9. HUNTER : J.Bact. 35, 20-21 1938
10. KALLIO u. PORTER : J.Bact. 60, 607-615 1950
11. LAMPEN : J.Biol.Chem. 180, 423-434 1949
12. LEVINE u. VAUGHN : J.Bact. 32, 65-73 1936
13. MOSSEL : Ann.Inst.Pasteur (Lille) 13, 108 1962
14. OLITZKI : J.Gen.Microbiol. 11, 160-174 1954
15. PETERSEN u. RUSTUM-ABU-GHAZALEH : Zschft.f.Hyg. u. Bakt. 146, 510 1960
16. TITTSLER u. SANDHOLZER : Amer.J.of Publ.Health 27 1937
17. WENDT-JANDER : Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie
18. WUNDT : Zschft.f.Hyg.u.Bakt. 144, 425-435 1958

Am Schluß meiner Arbeit
möge es gestattet sein,
Herrn Prof.Dr.M.K n o r r
für die Überlassung des
Themas und die im Laufe
der Arbeiten in reichem
Maße erteilten Ratschläge
und Anregungen meinen
ganz besonderen Dank zu
sagen.

L e b e n s l a u f

Als Sohn des Bergbeamten Franz Müller und seiner Ehefrau Wilhelmine, geborene Hein, wurde ich, Gerhard Fritz M ü l l e r , am 17. Juli 1940 in Karlsbad geboren.

Von April 1946 bis November 1948 besuchte ich in Ruppertenrod (Kr. Alsfeld) die dortige Volksschule und nach einem Wohnungswechsel nach Bamberg bis 1950 die Volksschule in Bamberg. Danach trat ich in die Oberrealschule ein, absolvierte neun Klassen und legte an dieser Anstalt 1959 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1959/60 schrieb ich mich als Student der Zahnmedizin an der Universität in Erlangen ein, bestand im März 1962 das Physikum und in der Zeit von März bis Juli 1965 das Staatsexamen mit der Gesamtnote "gut".

Im 10. und 11. Semester arbeitete ich als Doktorand im Hygienisch-Bakteriologischen Institut und seit Anfang August 1965 als Assistent an der Universitätsklinik für Zahn- Mund- und Kieferkrankheiten.

Offsetdruck - Fotodruck
Josef Hogl
8520 Erlangen, Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz,) Tel. 22990

Offsetdruck - Fotodruck

- J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Telefon 22990 -